

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**Tatiane Carla dos Reis**

**CONTROLE BIOLÓGICO COM OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *Beauveria*  
*bassiana* E *Metarhizium anisopliae* E SUAS INTERAÇÕES COM *Palmistichus elaeisis* E  
GLIFOSATO**

**Diamantina**

**2018**

**Tatiane Carla dos Reis**

**CONTROLE BIOLÓGICO COM OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* E SUAS INTERAÇÕES COM *Palmistichus elaeisis* E GLIFOSATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doctor Science.

Orientador: Marcus Alvarenga Soares

Coorientadora: Ivani Teixeira de Oliveira

**Diamantina  
2018**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R375c      Reis, Tatiane Carla dos  
Controle biológico com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e suas interações com *Palmistichus elaeis* e glifosato / Tatiane Carla dos Reis, 2018.  
75 p. : il.

Orientador: Marcus Alvarenga Soares

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

1. Compatibilidade. 2. Inimigos naturais. 3. Herbicidas. I. Soares, Marcus Alvarenga. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 632

**Tatiane Carla dos Reis**

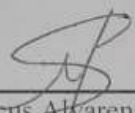
**CONTROLE BIOLÓGICO COM OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**  
*Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* E SUAS INTERAÇÕES COM  
*Palmistichus elaeisis* E GLIFOSATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doctor Science.

Orientador: Marcus Alvarenga Soares


Coorientadora: Ivani Teixeira de Oliveira

Data de aprovação 26/07/2018



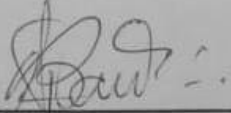
---

Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares - UFVJM



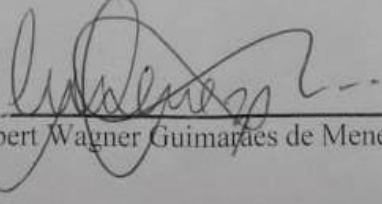
---

Prof. Dra Ivani Teixeira de Oliveira – UFVJM



---

Prof. Dr. José Barbosa dos Santos - UFVJM



---

Prof. Dr. Cleubert Wagner Guimarães de Menezes – IFNMG

Diamantina 2018

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força. Sinto sua presença sempre do meu lado, obrigada. Aos meus alicerces, Sebastião e Ana, caminho sempre pensando em vocês, na esperança de um dia retribuir tudo o que vocês fazem por mim. A minha família e amigos peço desculpas pela ausência, mas saiba que valeu a pena Obrigada.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e ao Departamento de Agronomia pela oportunidade de realização do meu curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Marcus Alvarenga Soares, pela sua orientação e apoio.

Aos professores José Barbosa e Ivani pela forma carinhosa e gentil que sempre me trataram durante o planejamento e execução desse trabalho. Ao prof. Cunha pela valiosa contribuição.

À técnica Giliane Rosa do laboratório de Fitopatologia, À Dra. Isabel Moreira da Silva pelo apoio na realização desse trabalho. Ao parceiro Rafael Santos pela imensa força durante minhas coletas de dados. Ao Rodrigo Cardoso e ao Gilson.

A minha parceira, Marinalva, pelo apoio e companhia.

Aos demais amigos que fiz em Diamantina e que estiveram por perto no dia a dia, e tornaram meus momentos em Diamantina mais agradáveis e felizes.

*Que maravilhas existem em uma criatura microscópica!*

*(Leeuwenhoek 1693)*

## RESUMO

Os fungos entomopatogênicos destacam-se no uso como agentes do controle biológico devido ao seu largo espectro de ação, colonizam diversas espécies de insetos e ácaros. Seu potencial de uso no MIP vêm sendo aumentado devido a sua produção em escala industrial. Devido o crescente uso destes agentes o conhecimento do efeito de micro-organismos entomopatogênicos sobre inimigos naturais e as condições favoráveis para a sua persistência e eficácia em ambientes sujeitos ao efeito de diversas práticas agrícolas torna-se necessário. Este trabalho tem por objetivo determinar os impactos do herbicida glifosato sobre a ecologia e epizootia dos fungos, avaliado a eficácia do controle biológico dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre a praga *Anticarsia gemmatalis* cultivados em meio com o herbicida glifosato e os impactos de uma possível associação simultânea com o parasitoide *Palmistichus elaeisis*. Os efeitos dos herbicidas sobre o crescimento micelial e produção de conídios apresentam variações entre os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para os isolados de *M. anisopliae* as diferentes formulações de glifosato não foram nocivas ao seu crescimento, porém, nocivas ao crescimento micelial dos isolados de *B. bassiana* nos isolados ISO11 e ISO25. A molécula pura glifosato inibiu a germinação dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em todas as doses. A formulação Roundup Original® foi a que menos afetou na germinação e o comprimento do tubo germinativo dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Todos os isolados de *M. anisopliae* cultivados em meio de cultura com diferentes formulações de glifosato, aplicados na concentração  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> mostraram-se patogênicos a *A. gemmatalis*. O isolado ISO 11, em meio de cultura com a molécula pura de glifosato permitiu que três lagartas se desenvolvessem até a fase adulta e uma lagarta atingiu o 4º instar. O parasitismo das fêmeas de *P. elaeisis* foi afetado pelos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Não ocorrendo a ação de parasitismo sobre pupas *Tenebrio molitor* expostas com o fungo *B. bassiana*. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não afetaram o desenvolvimento do parasitoide quando entraram em contato com pupas já parasitadas. A longevidade das fêmeas de *P. elaeisis* não sofreu alteração com a presença dos fungos *B. Bassiana* e *M. anisopliae* em nenhum dos tratamentos. Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram compatíveis com o *P. elaeisis*, assim, podendo ser utilizados em conjunto para suprimir insetos pragas.

**Palavras chaves:** Compatibilidade, Inimigos Naturais, Herbicidas.

## ABSTRACT

The entomopathogenic fungi stand out in the use as agents of the biological control due to their wide spectrum of action, they colonize several species of insects and mites. Its potential for use in IPM has been increased due to its industrial scale production. Due to the increasing use of these agents the knowledge of the effect of entomopathogenic microorganisms on natural enemies and favorable conditions for its persistence and efficacy in environments subject to the effect of various agricultural practices becomes necessary. The objective of this work was to determine the impacts of the herbicide glyphosate on the ecology and epizootics of fungi, evaluating the efficacy of the biological control of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the pest *Anticarsia gemmatalis* cultivated in the medium with the herbicide glyphosate and the impacts of a possible simultaneous association with the parasitoid *Palmistichus elaeisis*. The effects of herbicides on mycelial growth and conidia production present variations between the isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. For the isolates of *M. anisopliae*, the different formulations of glyphosate were not detrimental to their growth, but detrimental to the mycelial growth of *B. bassiana* isolates in the isolates ISO11 and ISO25. The pure glyphosate molecule inhibited the germination of *M. anisopliae* and *B. bassiana* isolates at all doses. The Roundup Original® formulation had the least effect on germination and germ length of the isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. All isolates of *M. anisopliae* cultivated in culture medium with different formulations of glyphosate, applied at the concentration of  $10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> were pathogenic to *A. gemmatalis*. The isolate ISO 11 in culture medium with the pure glyphosate molecule allowed three caterpillars to develop until adulthood and one caterpillar reached the 4th instar. The parasitism of *P. elaeisis* females was affected by fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*. There was no parasitism on *Tenebrio molitor* pupae exposed with *B. bassiana* fungus. The fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* did not affect the development of the parasitoid when they came in contact with pupae already parasitized. The longevity of *P. elaeisis* females did not change with the presence of *B. Bassiana* and *M. anisopliae* fungi in any of the treatments. The entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* were compatible with *P. elaeisis*, thus, being able to be used together to suppress insect pests.

**Keywords:** Compatibility, Natural Enemies, Herbicides.

## SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	12
2.2 <i>Beauveria bassiana</i> .....	14
2.3 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	15
3.FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS E SUAS INTERAÇÕES	
3.1 Hospedeiro.....	16
3.2 Herbicidas .....	20
3.3 Organismos não alvos.....	22
4 OBJETIVO GERAL.....	24
4.1 Objetivos específicos .....	24
CAPITULO I	
INTERAÇÃO DOS FUNGOS <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i> COM GLIFOSATO	
Resumo .....	33
Abstract .....	34
Introdução.....	35
Materiais e Métodos .....	36
Resultados.....	40
Discussão.....	47
Conclusão .....	49
Referências .....	49
CAPÍTULO II	
PATOGENICIDADE DE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i> CULTIVADOS EM MEIO COM GLIFOSATO A <i>Anticarsia gemmatilis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	
Resumo .....	53
Abstract .....	53
Introdução.....	55
Materiais e Métodos .....	56
Resultados.....	58
Discussão.....	59
Conclusão .....	60
Referências .....	60
CAPITULO III	
COMPATIBILIDADE DO PARASITOIDE <i>Palmistichus elaeisis</i> (Hymenoptera: Eulophidae) COM OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i>	
Resumo .....	63
Abstract .....	64
Introdução.....	65
Materiais e Métodos .....	66
Resultados.....	68
Discussão.....	71
Conclusão .....	73
Referências .....	73
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção agrícola do Brasil coloca-o como um dos principais fabricantes e exportador de alimentos, fibras e energia (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O ganho de produtividade veio acompanhado pela substituição de ecossistemas por vastas áreas de cultivo e pelo intenso uso de práticas agrícolas tais como os agrotóxicos, gerando perda de biodiversidade. O aumento da área produtiva tornou os insetos pragas os maiores concorrentes do homem por recursos gerados pela agricultura (OERKE; DEHNE, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014). A sucessão de culturas e aumento do uso de fertilizantes também corrobora com a susceptibilidade da cultura às pragas e para o aumento da incidência de insetos daninhos no campo (OERKE; DEHNE, 2004).

O modelo atual do sistema agrícola tem buscado conciliar um sistema produtivo, que conserve os recursos naturais e forneça produtos de qualidade para o consumo humano, com níveis de resíduos de agrotóxicos e contaminantes em conformidade com o que estabelece a legislação sanitária (MAPA, 2018). Seu grande desafio tem sido gerar resultados satisfatórios em meio a inúmeros impactos gerados por técnicas rudimentares ainda aplicadas na agricultura moderna. Desequilíbrios ecológicos possuem correlação direta com a intensificação das atividades agrícolas e silviculturais, devido, principalmente, à necessidade de uma maior utilização de produtos químicos (DENT *et al.*, 2000).

Com o aumento crescente da demanda por alimentos, o uso de produtos químicos intensificou-se a partir do século XX, chamada "idade das trevas do controle de pragas" (KOGAN, 1998; POPP *et al.*, 2013; PARRA, 2014). Neste período a produção de trigo, arroz e milho, as principais fontes de nutrição humana duplicaram (POPP *et al.*, 2013). No final de década de 50 porém, para resolver problemas originados pelo uso abusivo dos produtos químicos, surgiu uma nova filosofia de controle de pragas, o MIP - Manejo Integrado de Pragas (POPP *et al.* 2013; PARRA, 2014). Baseado na premissa que plantas são capazes de tolerar certos níveis de lesão sem reduzir economicamente seu rendimento, o MIP agrupa diferentes táticas de controle que possibilitam a sustentabilidade dos agroecossistemas, com considerações econômicas, ecológicas e sociais (PARRA, 2014; BORTOLOTTO *et al.*, 2015). Estas táticas incluem métodos de controle de pragas culturais, comportamentais (feromônios), genéticos, químicos e o controle biológico (PARRA, 2014)

Com baixo impacto ambiental, o controle biológico visa manter o agroecossistema mais próximo possível de um equilíbrio biológico, onde a densidade

populacional da praga se mantém sempre abaixo do nível de dano econômico (BORTOLOTTO *et al.*, 2015; ZANUNCIO *et al.*, 2018).

O controle biológico é um fenômeno natural com a regulação de uma população por outra. Neste fenômeno, o controle da densidade populacional é dado por inimigos naturais, agentes bióticos de mortalidade. Quando o controle biológico sofre a interferência do homem, com o objetivo de incrementar as interações antagônicas que ocorrem entre os seres vivos este é denominado como Controle Biológico Aplicado, podendo ser Clássico, Conservativo e Aumentativo (PARRA, 2014).

O Controle Biológico Clássico ocorre com a introdução de inimigos naturais exóticos, de um país para outro ou de uma região biogeográfica para outra. O Controle Biológico de Conservação envolve medidas que preservem os inimigos naturais em um agroecossistema, ou seja, manejo das práticas agrícolas de forma favorável a manutenção dos inimigos naturais no campo. O Controle Biológico Aumentativo implica na liberação inundativa ou inoculativa de inimigos naturais que ocorrem, naturalmente, na área de cultivo, após a criação massal em laboratório (GREATHEAD; GREATHEAD, 1992; PARRA, 2014).

No momento em que se discute produção integrada rumo a uma agricultura sustentável, o controle biológico assume importância cada vez maior em programas de MIP (LACEY *et al.*, 2001; 2015). Quando se compara o uso de ferramentas biológicas com agrotóxicos, deve-se levar em conta a garantia de segurança para os seres humanos e organismos não alvos, a redução de resíduos de químicos nos alimentos, o aumento da atividade de inimigos naturais e da biodiversidade nos ecossistemas (LACEY *et al.*, 2001; MAZID *et al.*, 2011). Em geral, observa-se maior segurança no uso de ferramentas biológicas, porém, apesar da sua toxicidade os agrotóxicos ocupam o lugar principal em relação ao volume total de aplicação no MIP (MAZID *et al.*, 2011).

Existem obstáculos a serem superados para aumentar o uso do Controle Biológico (LACEY *et al.*, 2015). Além do domínio das técnicas de criação de insetos em laboratório para que inimigos naturais possam ser liberados no campo, o aspecto cultural é outro elemento importante que limita o uso do Controle Biológico. O sucesso do controle biológico na agricultura europeia é alcançado por ser utilizado prioritariamente em estufas, como se observa na Holanda. No Brasil, país líder em agricultura tropical, as extensas áreas ocupadas apenas por uma cultura como soja - *Glycine max*, algodão - *Gossypium hirsutum* ou milho - *Zea mays* que podem chegar a 100.000 hectares, é necessário o desenvolvimento de técnicas

de criação massal e monitoramento, a fim de se liberar inimigos naturais no momento certo e em quantidade adequada (PARRA, 2014).

O elevado tempo na síntese de novas moléculas e os altos custos para sintetizá-las, que podem chegar a mais de 250 milhões de dólares por produto (PARRA, 2014), aliado às legislações internacionais que vêm exigindo cada vez mais que os agricultores restrinjam os níveis de resíduos da maioria dos agrotóxicos (MARX-STOELTING *et al.*, 2011, LACEY *et al.*, 2015), tem declinado consistentemente o uso de agrotóxicos no mercado global (THAKORE, 2006; BAILEY *et al.*, 2010).

A produção agrícola brasileira tem crescido progressivamente em resposta às demandas do mercado internacional, que são muito restritivas em relação aos resíduos químicos. Para reduzir os resíduos químicos nas culturas, o uso do Controle biológico apresenta-se como uma alternativa para os requisitos de exportação atendendo também a demanda nacional por programas de MIP (SOARES *et al.*, 2009). Empresas multinacionais produtoras de agrotóxicos perceberam a expansão do mercado de biológicos e, como resultado, têm adquirido empresas envolvidas com micro-organismos entomopatogênicos (PARRA, 2014).

Até o ano de 2006, 129 produtos com formulação a base de fungos entomopatogênicos já se encontravam disponíveis em todo mundo (JARONSKI, 2010). Estes produtos são compostos, principalmente, pelo filo Ascomycota, destacando os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Hirsutella*, *Nomuraea* e *Aschersonia* (JARONSKI, 2010; HUMBER 2012). No Brasil, atualmente, os fungos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Lecanicillium* spp. são utilizados como mico-inseticidas para o controle de vários artrópodes incluindo *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera, Curculionidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) (PARRA, 2014).

Os fungos entomopatogênicos possuem vantagens que favorecem seu desenvolvimento como agentes de controle biológico. Eles representam risco mínimo para organismos benéficos não alvos, como abelhas, minhocas e colêmbolos, que são os principais provedores de serviços ecossistêmicos, e inimigos naturais de artrópodes, como vespas parasitas e besouros predadores (POTRICH *et al.*, 2009; POLANCZYK *et al.*, 2010; LACEY *et al.*, 2015). Seu potencial de uso no MIP é aumentado por ser possível uma produção em escala industrial, onde sistemas de produção em massa foram concebidos para fornecer

grandes quantidades de inóculos que podem, então, ser formulados e aplicados repetidamente como sprays, grânulos e pó molhável (SHAH; PELL, 2003; BROWNBIDGE, 2006; CHARNLEY; COLLINS, 2007).

Produtos à base de fungos entomopatogênicos mostram um constante crescimento, o que desperta a preocupação sobre os possíveis efeitos em organismos não alvos, pois, estes fungos apresentam uma vasta gama de hospedeiro incluindo inimigos naturais (POTRICH *et al.*, 2009; POLANCZYK *et al.*, 2010).

Ainda existem poucos relatos na literatura conduzidos para determinar o efeito de micro-organismos entomopatogênicos sobre inimigos naturais (GOETTEL; HAJEK, 2001) e as condições favoráveis para a sua persistência e eficácia em ambientes sujeitos ao efeito de diversas práticas agrícolas (PELL *et al.*, 2010).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICOS**

Os fungos entomopatogênicos, assim chamados por invadir o corpo dos insetos e destruir seus tecidos causando a morte (SHAH; PELL, 2003). São observados frequentemente epizootias entre populações de insetos, o que destaca o grande potencial desses micro-organismos para o controle de espécies praga (KHAN *et al.*, 2012).

Os fungos são patógenos naturais ocorrentes nas populações de artrópodes. Mais de 700 espécies de fungos acerca de 90 gêneros, são patogênicas a insetos (KHAN *et al.*, 2012). São inimigos naturais de uma ampla variedade de artrópodes dentro das ordens Acari, Coleoptera, Diplopoda, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Blattodea, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonoptera, Thysanoptera (KHAN *et al.*, 2012; LACEY *et al.* 2015).

São encontrados nas divisões Zygomycota, Ascomycota, Chytridiomycota e Oomicetos, sendo que a maioria das espécies entomopatogênicas pertence aos dois primeiros grupos mencionados.

A grande parte dos produtos comerciais, mico-inseticidas ou mico-acaricidas, baseiam-se principalmente em *Beauveria* spp, *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* e *Lecanicillium* spp. (JARONSKI; JACKSON, 2008; FARIA; WRIGHT, 2007).

Fungos têm sido aplicados no controle de pragas do solo por incorporação direta ou de um veículo inerte ou nutritivo contendo propágulos fúngicos (conídios ou micélios), enquanto que para pragas que se alimentam das folhas, os fungos são aplicados por pulverizações de conídios em formulados contendo substâncias aditivas como espalhantes e adesivos (BROWNBRIDGE, 2006; JARONSKI, 2008; 2010; LACEY *et al.*, 2015).

Entre os atributos favoráveis para o uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico destaca-se seu largo espectro de ação, por serem capazes de colonizar diversas espécies de insetos e ácaros. Infectam o hospedeiro em todos os estádios de desenvolvimento, com boa capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, e não serem patológicos aos mamíferos (ALVES *et al.*, 2008, LACEY *et al.*, 2015, KHAN *et al.*, 2015).

*Beauveria* e *Metarhizium* spp. tendem a se dispersar passivamente, através de correntes de vento ou respingos de chuva. A transmissão também pode ocorrer quando insetos suscetíveis entraram em contato com indivíduos mortos infectados (MEYLING; EILENBERG, 2006; VEGA *et al.*, 2009).

Os conídios, estrutura reprodutiva assexuada, são a fase, normalmente, utilizada em campo em programas de controle biológico e envolvida no processo reconhecimento do hospedeiro durante a infecção (SANTI *et al.*, 2010; SHAHID *et al.*, 2012). A cutícula e o mesêntero de insetos são a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos (VEGA *et al.*, 2009). Quebras dessas barreiras desencadeiam reações imunológicas humorais e celulares (LAVINE; STRAND, 2002). As respostas de defesa humoral são realizadas pelos processos de coagulação da hemolinfa, melanização e produção de peptídeos antimicrobianos sem a participação direta dos hemócitos (VILMOS; KURUCZ, 1998). O meio de defesa celular são reações mediadas pelos diferentes tipos de hemócitos que é ativada após o reconhecimento dos patógenos (SCHMIDT *et al.*, 2001; SCHMID-HEMPEL, 2005). Os granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos, são os hemócitos mais abundantes que circulam livremente na hemolinfa de insetos. Estas células atacam micro-organismos invasores que são isolados por fagocitose formando agregados ou nódulos e/ou pela formação de uma cápsula multicelular ao redor do invasor de maior tamanho, processo conhecido por encapsulação (GILLESPIE *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.* 2001; SCHMID-HEMPEL, 2005).

O gasto energético para eliminar um patógeno pode comprometer componentes importantes no desenvolvimento do inseto e trazer consequências em diversos aspectos biológicos e reprodutivos, com devida importância em organismos não alvos (SCHMID-HEMPEL, 2005).

Um importante aspecto a ser abordado no estudo de fungos entomopatógenos é a variabilidade entre os isolados da mesma espécie, que podem apresentar diferentes níveis de similaridade genética e virulência. A grande variabilidade genética apresentada pelos fungos entomopatogênicos possibilita a seleção de isolados fúngicos altamente virulentos, mais específicos e tolerantes as condições agrícolas para serem utilizados como inseticidas microbianos (ALVES, 1998; SHAH; PELL, 2003).

## 2.2 *Beauveria bassiana*

Em 1835, Agostino Bassi, fez o primeiro relato do fungo *B. bassiana* causando doença em insetos, enunciando assim a teoria do “germe da doença” (ZIMMERMANN, 2007a). *Beauveria bassiana* (Vuillemin) foi observada em *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) causando grandes prejuízos aos produtores de seda. Agostino Bassi chamou-o de "muscardina branca" devido ao aspecto de mofo branco dado pela presença do micélio formando sobre os cadáveres dos hospedeiros (REHNER; BUCKLEY, 2005). O gênero *Beauveria* inclui espécies de fungos com grande potencial como agente de controle microbiano como *B. Bassiana* e *B. brongniartii* (Saccardo) Petch. Os fungos deste gênero são generalistas, não apresentando especificidade quanto ao hospedeiro. Além de sua ocorrência cosmopolita, são frequentemente encontrados sobre insetos, no solo ou em formas endofíticas em diferentes espécies de plantas (ALVES, 1998; POSADA; VEGA, 2005; MEYLING; EILENBERG, 2006).

*Beauveria bassiana* pertence à classe Ascomycota, caracterizado por colônias brancas a amareladas ou, ocasionalmente, avermelhadas. As células conidiogênicas consistem de parte basal globosa em forma de frasco e uma raque de até 20 µm de comprimento, formando normalmente um zig-zag. Os conídios são hialinos, globosos a largamente elipsoidais, geralmente com tamanho variando de 2-3 × 2-2,5 µm, com formação em aglomerados (ZIMMERMANN, 2007a).

*Beauveria bassiana* é a espécie mais amplamente distribuída do gênero. É geralmente encontrada em insetos infectados em áreas temperadas e tropicais em todo o mundo. Foi isolado de 63 espécies diferentes de insetos, coletadas em várias localidades em todo o Canadá (MACLEOD, 1954). Cepas de *B. bassiana* foram encontradas dentro dos tecidos pulmonares de 14 roedores, porém, exame histológico não mostrou que o fungo criasse uma condição patológica dentro destes tecidos (ZIMMERMANN, 2007a). Registrado

como patógeno nas ordens Blatodea, Coleoptera, Dermaptera, Diptera, Embioptera, Hymenoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Mantodea, Neuroptera, Orthoptera, Siphonaptera e Thysanoptera (MACLEOD, 1954; LEATHERDALE, 1970; ZIMMERMANN, 2007a).

O fungo *B. bassiana* formulado como microinseticida, vem sendo empregado em cultivos agrícolas em todo mundo. Na Europa mais de dois milhões de hectares já recebem aplicações a base de propágulos de *B. bassiana*. No Brasil, a aplicação de *B. bassiana* ocorre em cerca de 100 mil hectares (ZIMMERMANN, 2007a, PARRA, 2014). Dentre as vantagens do uso de entomopatógenos, destacam-se a facilidade de dispersão e a manutenção do inóculo em campo (ALVES, 1998).

### 2.3 *Metarhizium anisopliae*

O primeiro registro do gênero *Metarhizium* ocorreu em 1870 pelo pesquisador Metschnikoff realizando um trabalho de controle microbiano em larvas do besouro *Anisopliae austriaca* (Herbst) (Coleoptera: Scarabaeidae), em 1883, classificado por Sorokin como *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). Seu uso como agente de controle contra insetos pragas começou logo após a sua detecção (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007b).

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, anamorfo da classe Ascomycota, é amplamente utilizado para o biocontrole de insetos pragas e muitos produtos comerciais que utilizam seus conídios estão no mercado ou em desenvolvimento (ZIMMERMANN, 2007b, LACEY *et al.*, 2015).

Além dos fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* e *B. brongniartii*, o *M. anisopliae* é um dos fungos mais utilizados em todo o mundo, principalmente, como agente de controle inundativo (ZIMMERMANN, 2007; KHAN *et al.*, 2015). Durante os últimos 25 anos, vários micoinseticidas baseados em *M. anisopliae* foram comercializados e registrados em diversos países (FARIA; WRAIGHT, 2007).

Durante a colonização do interior do corpo do hospedeiro, metabólitos secundários são produzidos pelo gênero *Metarhizium*. Dentre os metabólicos estudados a enzima deuteróxinas (dtxs) é responsável por acelerar a morte do inseto infectado (ZIMMERMANN, 2007b). Os efeitos da deuteróxina nos hospedeiros são alteração do fluxo de íons cálcio, fosforilação de proteínas, inibição da H<sup>+</sup>ATPase e supressão da imunidade inata (ALVES, 1998.; PEDRAS *et al.*, 2002).



*Metarhizium anisopliae* é encontrado na natureza exposto a altas temperaturas em culturas tropicais ou, principalmente, na camada superior do solo (ZIMMERMANN, 2007b). Foi isolado de uma variedade de ecossistemas, podendo infectar mais de 200 espécies de insetos (MAGALHAES *et al.*, 2001; ONDIAKA *et al.*, 2008). Os principais projetos de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae*, no Brasil, visam supressão de *Mahanarva posticata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae), *Mahanarva fimriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae), *Deois flavopicta* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae), *Zulia entreriana* (Berg) (Hemiptera: Cercopidae), *Cornitermes cumulans* Kollar (Blattodea: Termidae), *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera:Curculionidae) (NEVES; ALVES, 2000; Gold et al. 201) e sobre várias espécies de carrapatos (QUINELATO *et al.*, 2012).

### 3. FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS E SUAS INTERAÇÕES

#### 3.1 HOSPEDEIRO

Os fungos entomopatogênicos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo essa característica desejável e muito peculiar desse grupo. Alguns mais agressivos, porém a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados como outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral (SHAH; PELL, 2003).

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como suscetibilidade do hospedeiro (ALVES, 1998). Nos sintomas iniciais da doença o hospedeiro cessa a alimentação, tornando-se letárgico, apresenta sintomas de paralisia, perde a coordenação dos movimentos e fica desorientado (ALVES, 1998)

Insetos pragas tem maior dificuldade para desenvolver resistências aos agentes de controle microbiano devido ao complexo modo de ação que possuem (SHAH; PELL, 2003). O mecanismo de ação das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae*, é geralmente o mesmo apresentado para outros fungos filamentosos e envolve as seguintes etapas: fixação do esporo; germinação; penetração através da cutícula; superação da resposta do hospedeiro (reações de defesa imunológica); disseminação no hospedeiro pela formação de corpos hifais; crescimento saprófito e produção de novos conídios.



Os fungos atacam seus hospedeiros em geral de forma percutânea, os esporos viáveis são retidos por contato na superfície do tegumento do inseto. A fixação é devido à hidrofobicidade dos conídios, bem como das superfícies cuticulares. Os conídios dos fungos têm elevado teor de aminopeptidases e hidrofobina. As hidrofobinas possuem papel essencial durante a colonização, crescimento e desenvolvimento fúngico (KERSHAW; TALBOT, 1998). São proteínas extracelulares hidrofóbicas e secretadas em abundância pelos fungos filamentosos, se apresentando na interface de contato. Durante a fixação dos conídios, as hidrofobinas, intercalam com uma superfície do inseto, um passo importante da interação patogênica antes da penetração fúngica, formando um filme anfipático, com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (KERSHAW; TALBOT, 1998; WÖSTEN; DE VOCHT 2000). Outra importante função realizada pelas hidrofobinas durante o desenvolvimento fúngico está no direcionamento da saída do fungo do meio aquoso para o ambiente hidrofóbico, onde o fungo cria estruturas aéreas como as hifas e os esporos (WÖSTEN; WESSELS, 1997; WÖSTEN, 2001).

A germinação do esporo inicia-se com um evento morfológico referido como inchaço e caracterizado por mudanças metabólicas tais como retomada da síntese protéica, favorecido pela alta umidade (acima de 70%) (PUCHETA *et al.*, 2006). A germinação do esporo inicia-se após cerca de 10h e, em geral, é amplamente concluída em 20h a 20-25°C, sendo desencadeada por mensageiros que, geralmente, são carboidratos presentes nas proteínas cuticulares do inseto (KHACHATOURIANS, 1996; PUCHETA *et al.*, 2006). Em insetos como as cigarrinhas-das-pastagens representadas por diferentes gêneros e espécies, a hidratação do esporo é favorecida pela ação de uma substância mucilagínosa secretada pelas glândulas epidérmicas do sétimo e oitavo segmento abdominal, denominado glândulas de Bateli, que também funcionam como protetor contra a presença de polifenóis e enzimas tóxicas segregadas pelo sistema imunológico do inseto (PUCHETA *et al.*, 2006). Durante a hidratação o esporo além da absorção de água, pode também absorver diferentes substâncias que podem afetar sua germinação (ZIMMERMANN, 2007a; 2007b). Lipídios encontrados na cutícula do hospedeiro (barreira de lipídios cuticulares), como ácidos graxos de cadeia curta, aldeídos, ésteres de cera, cetonas e álcoois que podem possuir atividade antimicrobiana (tóxica) ou efeito fungistático ou estimulatório. Os lipídios cuticulares atuam como uma barreira diversificada de compostos com muita variação no conteúdo e na composição, impedindo que o esporo entre em contato com os nutrientes e iniciem o sinal de disparo de germinação (KHACHATOURIANS, 1996; WÖSTEN, 2001). A cutícula também pode ser

revestida com substâncias que são importantes para o reconhecimento de fungos, como aminoácidos livres ou peptídeos, que podem desencadear a germinação (SCHMID-HEMPEL, 2005).

Áreas mais finas da cutícula e não esclerotizadas, como articulações entre segmentos ou ao redor do aparelho bucal, são susceptíveis a penetração dos fungos (SCHMID-HEMPEL, 2005). Infecções através da cavidade bucal em besouros, ponta do sifão respiratório em larvas de mosquitos ou no intestino também já foram relatados (SCHMIDT *et al.* 2001; SCHMID-HEMPEL, 2005). Antes da penetração, a ponta do tubo germinativo pode dilatar e formar os chamados apressórios que facilitará a invasão do fungo. O apressório serve para ancorar o esporo e exercer pressão em direção ao interior do inseto. Ao mesmo tempo, o fungo excreta um grande número de enzimas, incluindo proteases, quitinases, chitobiases, lipases, lipoxigenases e outras enzimas hidrolíticas degradando a cutícula e fornecendo nutrientes ao fungo (BARRANCO-FLORIDO *et al.*, 2002).

A penetração pelas camadas da cutícula (epicutícula-camada não quitinosa, formada principalmente por proteínas, lipídios e sais de cálcio e a procutícula – camada quitinosa formada pela exocutícula externa e uma endocutícula interna composta principalmente por quitina e proteína e sais de cálcio) e o início da invasão é acompanhada por várias atividades de resposta do hospedeiro, como a produção de pro-fenoloxidase (melanização) e hemócitos e peptídeos antimicrobianos (PAMs). As interações entre o fungo penetrante e o sistema imunológico do hospedeiro são processos complexos e compreendem muitas reações moleculares e celulares (VILCINSKAS; GOETZ, 1999). Durante o processo de infecção, os fungos entomopatogênicos produzem enzimas proteolíticas e toxinas, enquanto os insetos hospedeiros respondem com reações de defesa celular e humoral. Estas reações consistem na produção de compostos antifúngicos, inibidores de protease, que desintoxicam toxinas fúngicas no inseto. *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) possui uma resposta profilática ao entomopatógeno generalista *M. anisopliae*, sendo acentuada com o grau de melanização cuticular, que pode ser estimulado por altas densidades larvares e condições nutricionais (MORET; SIVA-JOTHY, 2003).

Após uma penetração bem sucedida, o fungo produz corpos hifais que proliferam no interior do corpo do inseto, ramificando-se para a procutícula constituída, principalmente, por fibrilas de quitina lamelares incorporadas em uma matriz de proteína que atua como cobertura física protetora para as secreções extracelulares do patógeno (PUCHETA *et al.*, 2006). Subsequentemente, os corpos de hifas invadem a epiderme e respectivamente a

membrana basal e são distribuídos na hemocele. Após a distribuição na hemocele, várias estruturas entre elas, tecido muscular, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, mitocôndrias, hemócitos, retículo endoplasmático e da membrana nuclear, são invadidas por crescimento vegetativo extenso e produção de toxinas. Quando os nutrientes se esgotam as hifas emergem na superfície iniciando a formação de esporos quando a umidade relativa é adequada (GILLESPIE; CLAYDON, 1989).

Durante a penetração do fungo, da cutícula do inseto para o hemocele, a hifa está imersa em proteínas, quitina, lipídios, melanina, difenóis e carboidratos; alguns deles são nutrientes, mas outros podem inibir o seu crescimento, através de processos tais como a melanização, a fagocitose, nodulação e encapsulamento, todas respostas do sistema imunológico do inseto (ST. LEGER; ROBERTS, 1996). No entanto, os fungos desenvolvem uma série de atividades que lhes permitem evitar tais defesas, como mudanças na parede celular e produção de substâncias imunomoduladoras (acentuam a resposta do sistema imune) e toxinas (KHACHATOURIANS, 1996)

O período de incubação depende do hospedeiro, do estágio hospedeiro, da temperatura e da virulência da cepa do fungo. Durante este período o fungo pode alterar mudanças comportamentais e alimentares no hospedeiro, como a redução de peso corporal, fecundidade ou provocar malformações (OUEDRAOGO *et al.* 2003).

Após a morte do hospedeiro e em condições favoráveis de umidade, o fungo inicia sua fase reprodutiva saindo do corpo do hospedeiro e produzindo conídios na superfície externa do cadáver. Em condições muito secas, o fungo pode também persistir no estágio de hifas no interior do cadáver (KHACHATOURIANS, 1996; OUEDRAOGO *et al.* 2003).

As propriedades físico-químicas da superfície do hospedeiro podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos micro-organismos (DONLAN; COSTERTON 2002). Alguns íons divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , reduzem as forças de repulsão eletrostática da superfície do inseto, alterando a hidrofobicidade e promovem a adesão na parede, desta forma criam condições favoráveis para o estabelecimento de esporos e a posterior invasão do hospedeiro (TÉLLEZ-JURADO *et al.*, 2009).

Devido à ampla gama de hospedeiros e a variabilidade genética com diferentes níveis de agressividade (ZIMMERMANN 2007) *B. bassiana* e *M. anisopliae* possuem grande possibilidade de utilização no controle de pragas da soja, incluindo *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), principal praga da soja (*Glycine max*) (PRAÇA *et al.*, 2006).

### 3.2 HERBICIDAS

Os agrotóxicos são reconhecidos como substâncias ou mistura de substâncias utilizadas com o objetivo de prevenir, destruir ou controlar qualquer praga. Eficientes no controle de pragas e apresentando custo relativamente compensador, os agrotóxicos tem uso frequente no mundo, e o Brasil aparece em destaque neste cenário. Dentre os agrotóxicos mais vendidos no mercado brasileiro, estão os herbicidas (48%), inseticidas (25%) e fungicidas (22%). O estado brasileiro que mais consome estes produtos é o Mato Grosso seguido de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Maranhão (TAVELLA *et al.*, 2012).

O uso em extensas áreas e com quantidades expressivas destes insumos tem sido questionado pela comunidade científica quanto à sustentabilidade dos agroecossistemas. Os componentes químicos dos agrotóxicos, princípio ativo, adjuvantes e aditivos, têm potencial de contaminação do ambiente devido às suas propriedades físico-químicas, assim como, a quantidade e a frequência de uso.

O controle de pragas é uma prática de elevada importância para obtenção de alto rendimento em qualquer cultivo agrícola. Os Herbicidas pertencem à classe de agrotóxicos que visa eliminar ou impedir o crescimento de plantas que competem por água, sol e nutrientes com os cultivos de interesse, comprometendo seu crescimento, denominadas daninhas (CAMILO *et al.*, 2012).

Os herbicidas podem ser classificados quanto à seletividade, época de aplicação, translocação e mecanismo de ação (WELLER, 2003). Dentre as várias classificações de herbicidas, destacam-se aqueles de amplo espectro de ação, como é o caso dos não seletivos que atuam indiscriminadamente sobre todas as plantas (AGUIAR *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2007).

O glifosato [n- (fosfonometil) glicina] é um herbicida com grande destaque na agricultura brasileira e mundial. Pode ser classificado como herbicida não-seletivo, sistêmico e pós-emergente, citado como o mais vendido em todo o mundo e em diferentes formulações (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002). Utilizado para o controle de um largo espectro de plantas daninhas, no Brasil o glifosato é aplicado em culturas como ameixa, arroz, banana, cacau, cana-de-açúcar, café, citros, eucalipto, maçã, milho, pastagens (MAPA, 2018).

O desenvolvimento de culturas transgênicas, como a soja (*Glycine max*), que possui em seletividade induzida ao glifosato, foi um fator para o aumento do uso desse

herbicida. O plantio de soja transgênica ocupa cerca de 80% das lavouras de soja no Brasil. Em geral, o glifosato é aplicado em dois momentos: em pré-plantio da cultura e em pós-emergência da cultura e da daninha. No pré-plantio ocorre de forma a limpar o solo de possíveis daninhas já existentes e na pós-emergência visa eliminar as daninhas que estão competindo com a cultura num momento crucial de seu desenvolvimento (CERDEIRA, 2007; RODRIGUES; SOUZA, 2018).

A soja permanece sendo a principal cultura agrícola brasileira em termos de volume de produção, área cultivada e exportação agrícola. Desde sua consolidação como a principal cultura do agronegócio brasileiro, a soja tem tido um crescimento expressivo em área cultivada (RODRIGUES; SOUZA, 2018).

Outras culturas também sofreram modificações genéticas e possuem resistência ao glifosato, tais como a canola, o milho e o algodão. Em função do uso intensivo do glifosato e perspectivas de aumento deste consumo, devido ao maior plantio de culturas resistentes a este herbicida, existe uma grande preocupação por parte de pesquisadores, sobre o comportamento desta molécula no ambiente.

Sua rota metabólica sobre as plantas tem início após uma rápida penetração, seguida por uma longa fase de lenta penetração, sendo que a duração dessas fases depende de numerosos fatores, incluindo espécie, idade, condições ambientais e concentração do glifosato e surfactante. O glifosato é móvel no floema e é rapidamente translocado por todas as partes da planta, mas tende a se acumular nas regiões meristemáticas. Foi sugerido que as cargas negativas da parede celular e do plasmalema repelem o glifosato, fortemente aniônico. O herbicida pode penetrar na planta através de outras rotas. Formulações solubilizadas em óleo permitiram ao glifosato penetrar pela casca de espécies arbóreas (TURNER; LOADER 1974). Raízes de cultivos em solução nutritiva contendo glifosato absorvem o herbicida, que se transloca através da planta (HADERLIE et al., 1978).

A avaliação da toxicidade dos agrotóxicos, em especial atenção para o glifosato devido ao seu grande volume aplicado no ambiente, é de grande importância para orientar na escolha de produtos seletivos mais adequados para a condução de um controle sustentável de pragas, sem impactos em organismos não alvos, tais como os fungos entomopatogênicos.

A suscetibilidade dos agentes microbianos a diferentes agrotóxicos vem sendo relatada. A maior parte dos ensaios realizados *in vitro*, tem a vantagem de expor ao máximo os micro-organismos à ação do agrotóxico, e vêm contribuindo para auxiliar na escolha de produtos que menos afetem o desenvolvimento dos patógenos, permitindo a manutenção de

fontes de inóculos, indispensáveis para o desencadeamento de epizootias (BATISTA FILHO, 2003).

Na cultura da soja, *M. anisopliae* foi observado como parasita facultativo de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) e *B. Bassiana* parasitando a lagarta *A. gemmatilis* (HOFFMANN-CAMPO, 2003; ROSSONI *et al.*, 2018).

O fungo *B. bassiana* associado ou não aos inseticidas constitui uma estratégia adequada para o controle de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (ALVES *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados ao se analisar efeitos de diversos agrotóxicos utilizados na cultura da alface e crisântemo sobre os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *L. lecanii*, onde determinou-se que os ingredientes ativos tiametoxam e imidacloprido foram compatíveis com todos os fungos estudados (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Ao testar a toxicidade *in vitro* de oito inseticidas, quatro fungicidas e cinco herbicidas sobre a germinação de conídios, crescimento vegetativo e viabilidade do fungo *M. anisopliae*, foi observado que os produtos comerciais Bravik (paration metílico), Actara (tiametoxam), Karate Zeon (lambdacialotrina), Roundup Original (glifosato), Basagran (bentazona) e Kifix (imazapic + imazapyr) foram compatíveis e podem ser utilizados em associação com o agente de biocontrole (SILVA *et al.*, 2005).

A utilização de produtos seletivos, combinados com métodos alternativos de controle é extremamente importante, por permitir uma menor necessidade de aplicações de agrotóxicos em campo, possibilitando o equilíbrio do agroecossistema com a manutenção dos organismos benéficos, garantindo, desta forma uma maior economia aos produtores, e principalmente a obtenção de produtos mais saudáveis para a população.

### 3.3- ORGANISMOS NÃO ALVOS

O uso simultâneo de agentes de biocontrole é uma alternativa para aumentar a eficiência do controle biológico (POLANCZYK *et al.*, 2010; POTRICH *et al.*, 2010; 2015). Entre os principais agentes utilizados com sucesso no Controle biológico no Brasil encontram-se aqueles da ordem Hymenoptera (**Tabela 01**).

Em contraste com outros entomopatogênicos (bactérias e vírus), que entram nos insetos através da ingestão, fungos entomopatogênicos penetram nos hospedeiros através do

tegumento. A morte do inseto é geralmente um resultado de danos mecânicos causados pelo crescimento do micélio dentro do inseto (mumificação) e das toxinas produzidas e disseminadas pelo patógeno (HAJEK; ST. LEGER 1994).

Os isolados ideais de patógenos utilizados como micoinseticidas devem ter uma estreita gama de hospedeiros, não infectando grupos benéficos de artrópodes e não apresentando riscos de desenvolver grandes epizootias em espécies não alvos após ser liberado no ambiente (KHAN, S. *et al.* 2012; LACEY, L. A. *et al.*, 2015)

Estudos de seletividade e efeitos de fungos entomopatogênicos com parasitoides apresentam resultados bastante diversificados, devido ao fato da variação na virulência de diferentes isolados de uma mesma espécie de entomopatogêno, grandes variações nas concentrações utilizadas e nas condições dos experimentos, porém, para evitar ou minimizar esses efeitos negativos, torna-se necessário selecionar patógenos específicos para apenas os insetos-alvos (GOETTEL; HAJEK 2001).

**Tabela 01.** Casos de sucesso do uso do Controle Biológico Aplicado no Brasil

Inimigo Natural	Praga	Cultura	Área/hectare	Referência
<i>Trichogramma atopovirilia</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)  <i>T. pretiosum</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)  <i>Helicoverpa zea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Milho	60.000	Cordeiro, 2006
<i>T. galloi</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)  <i>Cotesia flavipes</i> (Hymenoptera: Braconidae)	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae),	Cana-de-açúcar	500.000  3,3 milhões	Parra et al., 2010; 2015  Parra et al., 2015
<i>T. pretiosum</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)	<i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)  <i>Helicoverpa zea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Tomateiro	1.450	Haji et al., 2002
<i>T. pretiosum</i>	<i>Plutella xylostella</i> (Lepidoptera: Crambidae)	Repolho	1.000	Goulart, 2009

Trabalhos de interação entre patógenos e inimigos naturais sugerem que o fungo *B. bassiana* afeta negativamente parasitoides como: *Cotesia americanos* (Lepeletier)



(Hymenoptera: Braconidae) (VÁZQUEZ, 2002), *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) (SANTOS Jr. *et al.*, 2006a). *Metarhizium anisopliae* afeta negativamente os parasitoides: *O. sokolowskii* (SANTOS Jr. *et al.* 2006a) e *T. galloi* (BROGLIO-MICHELETTI *et al.* 2006). Outros trabalhos demonstram a inocuidade de *B. bassiana* a parasitoides como: *C. flavipes* (ROSSONI *et al.* 2014), *T. pretiosum*, *T. galloi* e *T. atopovirilia* (POTRICH *et al.*, 2009, 2015; POLANCZYK *et al.*, 2010), *O. sokolowskii* (SANTOS Jr. *et al.* 2006b).

Esta interação parasitoides-fungos entomopatogênicos está presente em muitos sistemas, assim como as interações entre hospedeiro-parasitoide-patógeno que podem ter papel significativo sobre populações e comunidades ecológicas.

Outro importante inimigo natural e agente promissor para ser utilizado no controle de lepidópteros desfolhadores é o *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) (ZANUNCIO *et al.* 2009). Um endoparasitoide de pupas, preferencialmente de lepidópteros, com hábito gregário que foi relatado em mais de 20 espécies (PEREIRA *et al.* 2008). Parasitoide com potencial para ser incluído no MIP-Soja no controle da principal praga da cultura, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) (Alcántara-de la Cruz *et al.* 2017)

Entender os resultados destas interações entre agentes de biocontrole, os padrões de mortalidade e os agentes biológicos presentes, pode ajudar a implementar programas de controle biológico no MIP, daí a necessidade de aperfeiçoamento e seleção de patógenos específicos (SANTOS Jr. *et al.* 2006; ROY; COTTRELL, 2008).

## **4 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficácia do controle biológico dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre a praga *Anticarsia gemmatilis* e os impactos de uma possível associação simultânea com o parasitoide *Palmistichus elaeisis*, além de determinar os impactos do herbicida glifosato sobre a ecologia e epizootia dos fungos.

### **4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito do herbicida glifosato puro e em diferentes marcas comerciais sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação e morfologia dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.



- Avaliar o controle biológico dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *A. gemmatilis* na concentração de  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> cultivados meios de cultura com diferentes formulações de glifosato.
- Observar o impacto sobre os parâmetros reprodutivos, longevidade e índice de parasitismo do parasitoide *P. elaeisis* emergidos de pupas de *T. molitor* expostas aos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. *et al.* Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 185, p. 94-101, 2016.

ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R. *et al.* Side-effects of pesticides on the generalist endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10064, 2017.

ALVES, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba. FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S. B. *et al.* Eficácia de *Beauveria bassiana*, imidacloprid e thiacloprid no controle de *Bemisia tabaci* e na incidência do BGMV. *Manejo Integrado de Plagas*, Costa Rica, n. 61, p. 3-36, 2001.

AMARANTE JÚNIOR *et al.* Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

BAILEY, K. L.; BOYETCHKO, S. M.; LÄNGLE, T. Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 221-229, 2010.

BARRANCO-FLORIDO, J. E. *et al.* Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 7, p. 910-915, 2002.

BATISTA FILHO, A. *et al.* Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 70, n. 1, p. 61-67, 2003.

BORTOLOTTI, O. C. *et al.* The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. **Agronomy Science and Biotechnology**, v.1, n.1, p. 25-32, 2015.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA-BARROS, J. L. Efeito de herbicida, inseticidas químico, biológico e botânico sobre *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Magistra**, v. 18, p. 21-26, 2006.

BROWNBRIDGE, M. *et al.* Field application of biopolymer-coated *Beauveria bassiana* F418 for clover root weevil (*Sitona lepidus*) control in Waikato and Manawatu. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p. 304, 2006.

CAMILO, S.S. *et al.* Impactos toxicológicos de herbicidas recomendados para a cultura do milho em ninfas do predador *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 3, p. 339-346, 2012.

CERDEIRA, A. L. *et al.* Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, n. 5, p. 539-549, 2007.

CHARNLEY, A. K.; COLLINS, S. A. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. **Environmental and microbial relationships**, v. 4, p. 159, 2007.

DENT, D. *et al.* Yield loss. **Insect pest management**, n. Ed. 2, p. 48-80, 2000.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

GILLESPIE, J. P. *et al.* Fungi as elicitors of insect immune responses. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 44, n. 2, p. 49-68, 2000.

GILLESPIE, A.T.; CLAYDON, N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. **Pesticide Science**, v. 27, n. 2, p. 203-215, 1989.

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E. Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. **Evaluating indirect ecological effects of biological control**, p. 81-97, 2001.

GREATHEAD, D. J.; GREATHEAD, A. H. Biological control of insect pests by insect parasitoids and predators: the BIOCAT. **Biocontrol**, v. 13, n. 4, p. 61-68, 1992.

HADERLIE, L. C.; SLIFE, F. W.; BUTLER, H.S. <sup>14</sup>C-glyphosate absorption and translocation in maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) seeds and in soybean plants. **Weed Research**, v. 18, p. 269-273, 1978

HOFFMANN-CAMPO, C. B. *et al.* Integrated pest management in Brazil. **Integrated pest management in the global arena**. CABI Publishing, Wallingford and Cambridge, p. 285-299, 2003.

HUMBER, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. 2012. In: **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)**, 151 p.

JARONSKI, S.T.; JACKSON, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 8, p. 849-863, 2008.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 159-185, 2010.

KERSHAW, Michael J.; TALBOT, Nicholas J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, n. 1, p. 18-33, 1998.

KHACHATOURIANS, G. G.1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: **Human and animal relationships**. Springer, Berlin, Heidelberg, 331p.

KHAN, S. *et al.* Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. **Molecular Plant Breeding**, v. 3, n. 1, 2012.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 243-270, 1998.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. **Biological control**, v. 21, n. 3, p. 230-248, 2001.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

LEATHERDALE, D. The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain. **Entomophaga**, v. 15, n. 4, p. 419-435, 1970.

LOUREIRO, E. S. *et al.* C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. *Neotropical Entomology*, v. 31, n. 2, p. 263-267, 2002.

MACLEOD, D. M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill, and *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal of Botany**, v. 32, n. 6, p. 818-890, 1954.

MAGALHAES, B. P. *et al.* The use of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* against the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Journal of Orthoptera Research*, v. 10, p. 199-202, 2001.

MARTIN, E.A. *et al.* Natural enemy interactions constrain pest control in complex agricultural landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1-6, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. [http:// agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). (accessed date: 20 out. 2018).

MAZID, S.; KALITA, J. C.; RAJKHOWA, R. C. A review on the use of biopesticides in insect pest management. **International journal of science and advanced technology**, v. 1, n. 7, p. 169-178, 2011.

MARX-STOELTING, P. *et al.* Assessment strategies and decision criteria for pesticides with endocrine disrupting properties relevant to humans. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 574-584, 2011.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J.. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. **Mycological Research**, v. 110, n. 2, p. 188-195, 2006.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1532, p. 2475-2480, 2003.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. **Crop protection**, v. 23, n. 4, p. 275-285, 2004.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

OLIVEIRA, D. G. P. *et al.* A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

ONDIKA, S. *et al.* Virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to sweet potato weevil *Cylas puncticollis* and effects on fecundity and egg viability. *Annals of Applied Biology*, v. 153, p. 41-48, 2008.

OUEDRAOGO, R. M. *et al.* Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 82, n. 2, p. 103-109, 2003.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.

PEDRAS, M. S. C.; ZAHARIA, L. I.; WARD, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v. 59, n. 6, p. 579-596, 2002.

PELL, J. K.; HANNAM, J. J.; STEINKRAUS, D. C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 187-198, 2010.

PEREIRA, F. F. *et al.*, Species of Lepidoptera Defoliators of Eucalyptus as New Host for the Parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 259-262, 2009.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 33, n. 1, p. 243-255, 2013.

POLANCZYK, A. R. *et al.*. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin nos parâmetros biológicos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1412-1416, 2010.

POSADA, F.; VEGA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1195-1200, 2005.

POTRICH, M. *et al.*. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 822-826, 2009.

POTRICH, M. *et al.* Interactions between *Beauveria bassiana* and *Trichogramma pretiosum* under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 3, p. 213-221, 2015.

PUCHETA D.M. *et al.*,. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 856-860, 2006.

QUINELATO, S. *et al.* Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* sl isolates on *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus larvae. **Veterinary parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 556-565, 2012.

REHNER, S.A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84-98, 2005.

RODRIGUES, N. R.; DE SOUZA, A. P. F. Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 4, p. 723-730, 2018.

ROSSONI, C. *et al.* Natural Occurrence of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hyphomycetes: Moniliales) on *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in the State of Mato Grosso do Sul. **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 2, p. 162-164, 2013.

ROSSONI, C. *et al.* *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, v. 97, p. 1794-1804, 2014.

ROY, H. E.; COTTRELL, E. Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 391-398, 2008.

SANTI, L. *et al.* Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 874-880, 2010.

SANTOS JR, H.J.G. *et al.* Interação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. eo parasitoide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre larvas da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Ellipsoidal). **Neotropical entomology**, v. 35, p. 241-245, 2006a.

SANTOS JR.. *et al.* Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch. Sorok. E *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre adultos de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p.241-245, 2006b.

SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U.; STRAND, M.. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. **BioEssays**, v. 23, n. 4, p. 344-351, 2001.

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 529-551, 2005.

SHAHID, A. A. *et al.* Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 1, p. 21-42, 2012.

SHAH, P. A.; PELL, J. K.. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 413-423, 2003.

SILVA, R. Z. *et al.* Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, 2005.

SOARES, M.A.; *et al.* Superparasitismo de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) y comportamiento de defensa de dos hospederos. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 35, p. 62-65, 2009.

ST-LEGER, R. J. *et al.* Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 13, p. 6349-6354, 1996.

TAVELLA, L. B. *et al.* O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 06-12, 2012.

TÉLLEZ-JURADO, Alejandro *et al.* Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. **Revista mexicana de micología**, v. 30, p. 73-80, 2009.



THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 194-208, 2006.

TURNER, D. J.; LOADER, M. P. C. Studies with solubilized herbicide formulations. In: BRITISH WEED CONTROL CONFERENCE, 12., 1974, Brington. Proceedings... London, 177 p.

VÁZQUEZ L. L. Efecto de *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Cotesia americanus* (Lepeletier) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de larvas de la primavera de la yuca (*Erinnyis ello* L.) **Fitosanidad**, v. 6, p. 24-27, 2002.

VEGA, F. E. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

VILCINSKAS, A.; GÖTZ, P. 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 267p.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology letters**, v. 62, n. 2, p. 59-66, 1998.

WELLER, Michael G. *et al.* Development of antibodies for the detection of N-acetylglucosamine. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6668-6675, 2003.

WÖSTEN, H. A. B. Hydrophobins: multipurpose proteins. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 625-646, 2001.

WÖSTEN, H. A. B.; WESSELS, Joseph GH. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. **Mycoscience**, v. 38, n. 3, p. 363-374, 1997.

WÖSTEN, H.A. B.; DE VOCHT, M. L. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 2, p. 79-86, 2000.

ZANUNCIO, J. C. *et al.* Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 245-250, 2018.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007b.





## CAPÍTULO I

### INTERAÇÃO DOS FUNGOS *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* COM GLIFOSATO

#### RESUMO

O uso de herbicidas à base de glifosato está intimamente associado à agricultura intensiva, de modo que esses compostos são liberados no meio ambiente constantemente e em grandes quantidades. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação de isolados fúngicos obtidos da linhagem WP PL63 de *Beauveria bassiana* e da linhagem WP E9 de *Metarhizium anisopliae* cultivados em meio Sabouraud Dextrose Aguar (SDA) com quatro formulação do herbicida glifosato, visando avaliar o crescimento micelial, a produção de conídios e análise morfologica de suas estruturas. Os isolados foram embebidos em soluções dos herbicidas por uma hora para a avaliação da germinação e comprimento do tubo germinativo. Os efeitos dos herbicidas sobre o crescimento micelial e produção de conídios apresentam variações entre os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para os isolados de *M. anisopliae* as diferentes formulações de glifosato não foram nocivas ao seu crescimento, porém, nocivas ao crescimento micelial dos isolados de *B. bassiana* (ISO11 e ISO25) cultivados em meio com os herbicidas Roundup Original® e Roundup WG®. As diferentes formulações do glifosato inibiram a produção de conídios nos isolados ISO01 e ISO02 de *M. anisopliae* e nos isolados ISO11 e ISO25 de *B. bassiana*, sendo as formulações do Roundup Original® e Roundup WG® que mais inibiram a esporulação nos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. A molécula pura glifosato inibiu a germinação dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em todas as doses. A formulação Roundup Original® foi a que menos afetou na germinação e o comprimento do tubo germinativo dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para o uso no Manejo Integrado de Pragas, *B. bassiana* mostrou-se mais compatível do que *M. anisopliae*, com as formulações à base de glifosato

**Palavras-chave:** Variabilidade, Herbicidas, Seletividade.

## CHAPTER I

### INTERACTION OF FUNGI *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* WITH GLYPHOSATE

#### ABSTRACT

The use of herbicides based on glyphosate is closely associated with intensive agriculture, so that these compounds are released into the environment in large quantities. The objective of this work was to evaluate the interaction of fungal isolates obtained from the WP PL63 strain of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) and the WP E9 strain of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Nectriaceae) cultivated in SDA medium with four glyphosate herbicide formulations, aiming to evaluate mycelial growth, conidia production and morphological analysis of its structures. The isolates were soaked in solutions of the herbicides for one hour for the evaluation of germination and germ length. The effects of herbicides on mycelial growth and conidia production present variations between the isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. For the isolates of *M. anisopliae*, the different formulations of glyphosate were not detrimental to their growth, but detrimental to the mycelial growth of *B. bassiana* (ISO11 and ISO25) isolates grown in medium with Roundup Original® and Roundup WG herbicides ®. The different formulations of glyphosate inhibited the production of conidia in the ISO01 and ISO02 isolates of *M. anisopliae* and in the ISO11 and ISO25 isolates of *B. bassiana*, with the formulations of Roundup Original® and Roundup WG® being the most effective in sporulation isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. The pure glyphosate molecule inhibited the germination of *M. anisopliae* and *B. bassiana* isolates at all doses. The Roundup Original® formulation was the one that affected the germination and the germ tube length of the isolates of *M. anisopliae* and *B. bassiana*. For use in Integrated Pest Management, *B. bassiana* proved to be more compatible than *M. anisopliae*, with glyphosate-based formulations

**Key words:** Variabiliade, Herbicides, Selectivity.

## INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin da ordem Hypocreales, filo Ascomycota, têm distribuição mundial como membros da flora natural do solo (ZIMMERMANN *et al.*, 2007a, 2007b).

*Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* tem sido amplamente utilizados como agente microbiológicos no controle biológico de inundação e inoculação no sistema agricultura e silvicultura (ZIMMERMANN *et al.*, 2007a, 2007b, JARONSKI, 2010). Possuem a vantagem de serem mais adequados para o desenvolvimento como biopesticidas, ao contrário das bactérias e vírus, pois infectam os insetos por penetração direta da cutícula e, portanto, funcionam como inseticidas de contato (KHAN *et al.*, 2012).

No Brasil, 75% dos produtos existentes à base de fungos entomopatogênicos são comercializados na forma de conídios puros ou concentrados técnicos (como conídios colonizados em arroz parbolizado), e apenas 25% dos produtos são formulados (FARIA; WRAIGHT, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015)

O uso de grandes áreas e quantidades expressivas de insumos agrícolas pode inviabilizar os propágulos fúngicos afetando a qualidade desses agentes microbiológicos. O glifosato [n- (fosfometil) glicina] é um herbicida com grande destaque pelo volume usado na agricultura brasileira e mundial (RODRIGUES; SOUZA, 2018). Herbicida sistêmico, não seletivo, controla plantas daninhas inibindo a síntese da enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) que sintetiza aminoácidos aromáticos necessários para a formação de proteínas em plantas susceptíveis. O glifosato não é conveniente em culturas em crescimento, quando estas forem convencionais, ou híbridas simples. Seu volume de aplicação tem sido aumentado com o desenvolvimento de culturas transgênicas, resistentes a esse herbicida.

A compatibilidade de agroquímicos com fungos entomopatogênicos é conhecida por variar entre os isolados fúngicos e concentrações destes produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Em virtude do potencial de variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos, conhecer os fatores ambientais, como o uso de praticas agrícolas, entre eles a aplicação do herbicida glifosato que interferem na viabilidade destes fungos, torna-se necessário.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do herbicida glifosato puro e em diferentes marcas comerciais sobre o crescimento micelial, produção de conídios, morfologia e germinação dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Insetos e no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, no município de Diamantina, Minas Gerais.

### OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Os isolados fúngicos foram obtidos da linhagem WP PL63 de *Beauveria bassiana* por meio do produto comercial Boveril<sup>®</sup> WP PL63 e da linhagem WP E9 de *Metarhizium anisopliae* por meio do produto comercial Metarril<sup>®</sup> WP E9. Ambos produtos da empresa Koppert Biological Systems. De cada produto comercial foi retirado 0,1g do pó molhável e suspenso em 10mL de solução esterilizada do espalhante adesivo Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01%. Após agitação a suspensão foi diluída sucessivamente na mesma solução esterilizada de Tween<sup>®</sup> 80 até obtenção  $10^2$  conídios mL<sup>-1</sup>, quantificada utilizando uma câmara Neubauer em microscópio. Em seguida, 100 µL da suspensão de conídios de cada fungo foi espalhada em três placas de Petri de 11cm de diâmetro em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação, três fragmentos de micélio foram retirados de colônias isoladas de *B. bassiana* e identificados como ISO11, ISO25 e ISO26 e das colônias isoladas de *M. Anisopliae* e identificados como ISO01, ISO02 e ISO03. Os seis isolados foram repicados para o mesmo meio de SDA e incubados por mais 15 dias nas mesmas condições. A partir dessas culturas, novas culturas dos seis isolados com 15 dias de idades foram produzidas nas mesmas condições para realização do ensaio de crescimento micelial, morfologia e germinação.

### EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL, PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E MORFOLOGIA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *M. Anisopliae* e *B. bassiana*

O crescimento micelial e produção de conídios e a morfologia dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi avaliado sob a ação de quatro formulações de glifosato, apresentados na tabela 01. O controle composto por 5 mL de solução esterilizada do espalhante adesivo Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01%. As soluções dos herbicidas foram preparadas em 5 mL de água destilada e esterilizada por filtração com o filtro Millipore 0,22µm e adicionadas diretamente no meio de cultura SDA fundente. A dose dos herbicidas foi calculada de acordo com o diâmetro médio das placas de Petri. As soluções de herbicidas foram adicionadas ao meio de cultura SDA fundente na dose de 68,4 mg L<sup>-1</sup> e.a por placa. Foram vertidos 20 mL do meio fundente para placas de Petri de 11 cm de diâmetro com auxílio da pipeta tipo Kipp. O crescimento micelial foi avaliado retirando três discos do crescimento fúngico com 3 mm de diâmetro, das bordas de crescimento das colônias com 15 dias de idade e distribuídos em três pontos equidistantes na placa de Petri. Foram utilizadas cinco placas por tratamento, cada disco foi considerado uma parcela, totalizando 15 repetições. As placas foram incubadas a 25 °C por 15 dias com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período o diâmetro de cada colônia foi medido com o auxílio de uma régua milimetrada em dois eixos ortogonais e calculada a média de comprimento das duas medidas para quantificar o crescimento em diâmetro.

A produção de conídios sucedeu após o término do ensaio de crescimento micelial. Seis colônias do ensaio de crescimento micelial, de cada isolado de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram selecionadas aleatoriamente para realização da avaliação da produção de conídios. Um disco do fragmento do crescimento fúngico de 5mm de diâmetro foi retirado das bordas das colônias e transferido para um eppendorf com 1 mL de solução esterilizada de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01% e homogeneizado com agitação por 1 min no vórtex. Em seguida, 100 µL da suspensão de conídios foi colocado na câmara Neubauer em microscópio e quantificado a produção de conídios. Cada tratamento foi composto por seis repetições, sendo cada repetição composta por três discos de micélio.

As alterações morfológica das estruturas fungicas, células conidiogênicas e hifas, foram avaliados através do microcultivo em lâmina. Previamente, foi realizado a esterilização de cada placa utilizada para o microcultivo. Cada placa foi consistida de um disco papel filtro depositado no fundo da placa de Petri para manter a umidade. Em seguida, dois cotonetes foram depositados sobre o papel como suporte para uma lâmina de vidro de 76 x 26 mm e uma lamínula. Após a esterilização, foi depositado três discos de 11 mm do meio de cultura SDA contendo as quatro formulações do herbicidas sobre a lâmina, o controle foi constituído

somente do meio SDA. Nas bordas dos discos de 11 mm foram depositados fragmentos de hifas das colônias com 15 dias de idade, com auxílio de alça de inoculação esterilizada em bico de Bunsen. Na sequência uma lamínula esterilizada foi disposta sobre o disco. Dois mililitros de água destilada foi adicionada no papel de filtro com auxílio de uma pipeta. O microcultivo foi incubado a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após três dias foram realizadas as observações em microscópio óptico. Cada tratamento foi composto por seis repetições.

**Tabela 01** Denominações dos produtos, composição e doses de glifosato empregados para avaliação do crescimento micelial, produção de conídios e morfologia dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*

PRODUTO	COMPOSIÇÃO	DOSES
PMG	N- (fosfonometil) glicina	68,4 mg L <sup>-1</sup>
Molécula Pura Glifosato		
Roundup Original®	Sal de Isopropilamina 360 g L equivalente ácido	190 mg L <sup>-1</sup>
Roundup WG®	Sal de Amônio 720 g kg equivalente ácido	95 mg L <sup>-1</sup>
Roundup Ultra®	Sal de Amônio 650 g kg equivalente ácido	105 mg L <sup>-1</sup>

#### EFEITO DO GLIFOSATO NA GERMINAÇÃO DE *B. bassiana* e *M. anisopliae*

A germinação e o comprimento do tubo germinativo dos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram realizados através da embebição dos conídios em soluções de glifosato. As soluções dos herbicidas (**Tabela 02**) foram preparadas a partir da dose média usual recomendada (DR) para aplicação em campo, 1440g e.a ha<sup>-1</sup> para o volume de calda de 120 L ha<sup>-1</sup>. Foram utilizadas mais duas concentrações para a avaliação, a subdose (DR-50%), 720g e.a ha<sup>-1</sup> e a sobredose (DR+100%) 2880g e.a ha<sup>-1</sup>. As soluções foram preparadas em 5 mL de solução esterilizada de Tween® 80 a 0,01%. Após o preparo, as soluções foram esterilizadas por filtração com o filtro Millipore 0,22µm. Um disco de 5mm de diâmetro do fragmento do crescimento fungico de 15 dias de idade foi retirado das bordas das colônias e transferido para um eppendorf com 1 mL de solução esterilizada de Tween® 80 a 0,01% e homogeneizado com agitação por 1 min no vórtex. Os conídios de *B. bassiana*, *M. anisopliae* permaneceram suspensos por uma hora nas soluções dos herbicidas (NEVES *et al.*, 2001). Após uma hora de hidratação, 50 µL de cada tratamento foram semeados em um disco de meio ágar-ágar de 9 mm na face superior de lâminas de microscopia esterilizada. Foram utilizados, para cada tratamento, três discos de ágar-ágar de 9 mm. As lâminas foram acondicionadas, individualmente, em câmara úmida constituída de placa de Petri esterilizada

com um disco de papel filtro umedecido para manter um microclima favorável para germinação dos conídios e incubadas a 25 °C por 20 horas com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, 100 a 150 conídios foram contados em um cada disco de ágar-ágar. O tubo germinativo de 30 conídios considerados germinados foram medidos. A observação dos conídios foi realizada utilizando-se microscópio com aumento de 40x. Foram contados conídios germinados e não germinados, estabelecendo-se a porcentagem de germinação. O conídio é considerado germinado quando o comprimento do tubo germinativo excede o diâmetro do conídio (LUZ; FARGUES, 1997).

Com o objetivo de verificar se houve morte dos conídios pelo PMG no ensaio de germinação, foram semeados em placas de petri com meio SDA 100 µL da suspensão de conídios dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* que permaneceram suspensos por uma hora na solução de PMG. As placas foram incubadas a 25 °C por 72 horas com fotoperíodo de 12 horas.

**Tabela 02** Denominações dos produtos, composição e doses de glifosato empregados para avaliação da germinação dos conídios dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*

PRODUTO	COMPOSIÇÃO	DOSE (g L)
PMG	N- (fosfometil) glicina	0,006 <sup>DR+50%</sup>
		0,012 <sup>DR</sup>
		0,024 <sup>DR+100%</sup>
Roundup Original®	Sal de Isopropilamina 360 g L e. a	0,0167 <sup>DR+50%</sup>
		0,0333 <sup>DR</sup>
		0,0667 <sup>DR+100%</sup>
Roundup WG®	Sal de Amônio 720 g kg e. a	0,0083 <sup>DR+50%</sup>
		0,0167 <sup>DR</sup>
		0,0333 <sup>DR+100%</sup>
Roundup Ultra®	Sal de Amônio 650 g kg e.a	0,0092 <sup>DR+50%</sup>
		0,0185 <sup>DR</sup>
		0,0369 <sup>DR+100%</sup>

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente causalizado. As comparações dos tratamentos com a testemunha foram feitas através da aplicação do teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

### EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS e MORFOLOGIA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *M. anisopliae* e *B. bassiana*

Os efeitos do glifosato sobre *M. anisopliae* e *B. bassiana*, estão apresentados na tabela 02 e 03. Houve toxidez da molécula pura do glifosato reduziu a produção de conídios apenas no isolado ISO01 de *M. anisopliae* (**Tabela 03**) e o crescimento micelial do isolados ISO11 de *B. bassiana* (**Tabela 04**)

Para a maioria da formulações os isolados ISO02 e ISO03 não foram afetados (**Tabela 03** e **Tabela 04**). O Roundup Original® e Roundup WG® diminuiu o o efeito na produção de conídios em relação ao PMG no ISO01 (**Tabela 04**).

Os isolados ISO02 e ISO03 conseguiram produzir um maior número de conídios quando foram cultivados em meio de cultura com a formulação Roundup Ultra® (**Tabela 03**). Nos isolados ISO11 e ISO25 de *B. bassiana* a produção de conídios foi inibida pelas formulações do glifosato do Roundup Original® e Roundup WG® (**Tabela 04**)

As figuras 1 e 2 apresentam os aspectos morfológicos sempre observados nas hifas, células conidiogênicas e conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, nos tratamentos avaliados. Não foram observadas diferenças morfológicas nessas estruturas (**Fig. 1 e Fig. 2**)

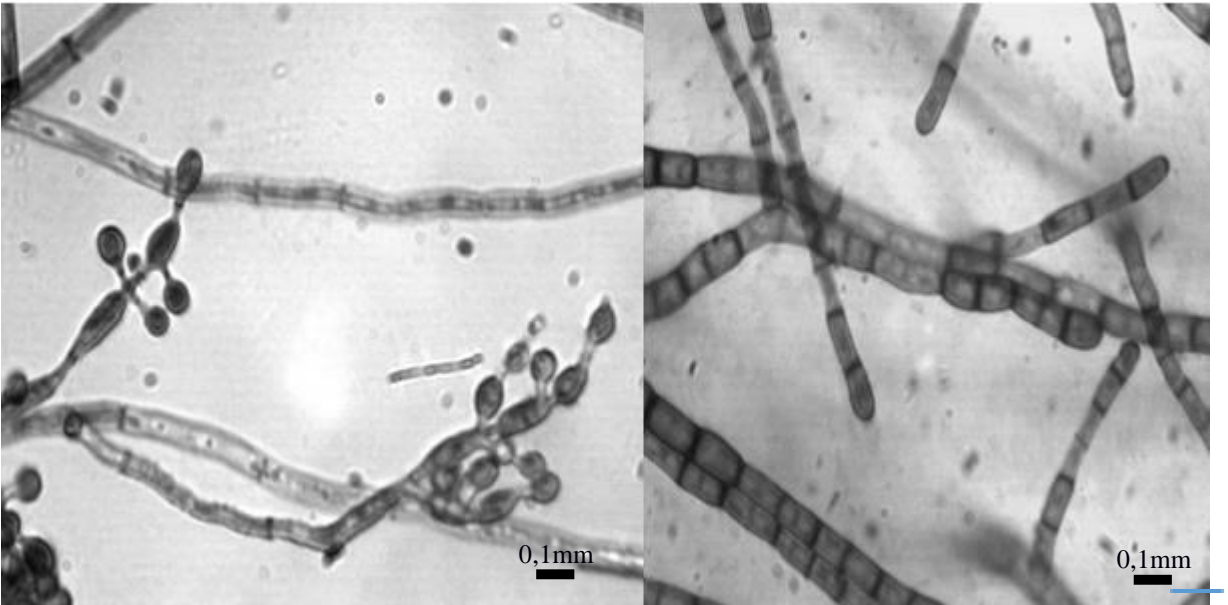


**Tabela 03** Produção de conídios (cnds mL<sup>-1</sup>), Crescimento micelial (CM) dos isolados do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* cultivados em diferentes formulações de glifosato.

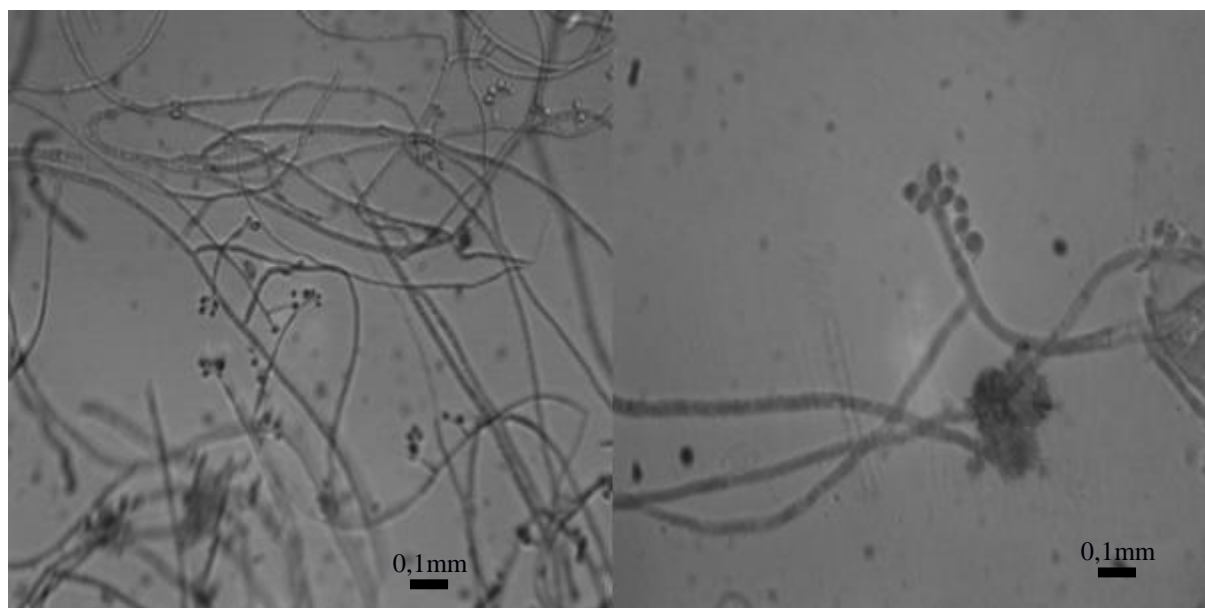
<i>Metarhizium anisopliae</i>						
	ISO01		ISO02		ISO03	
SDA + herbicida	Conídios 10 <sup>8</sup> cnds mL	C. M (cm)	Conídios 10 <sup>8</sup> cnds mL	C. M (cm)	Conídios 10 <sup>8</sup> cnds Ml	C. M (cm)
Controle	127,17	2,79	92,33	2,82	80,17	2,79
PMG	39,17 <sup>-</sup>	2,81 <sup>ns</sup>	56,17 <sup>ns</sup>	2,89 <sup>ns</sup>	73,0 <sup>ns</sup>	2,82 <sup>ns</sup>
Roundup Original <sup>®</sup>	52,0 <sup>-</sup>	2,7 <sup>ns</sup>	86,63 <sup>ns</sup>	2,59 <sup>ns</sup>	63,67 <sup>ns</sup>	2,62 <sup>ns</sup>
Roundup WG <sup>®</sup>	36,17 <sup>-</sup>	2,8 <sup>ns</sup>	42,83 <sup>-</sup>	2,77 <sup>ns</sup>	53,33 <sup>ns</sup>	2,55 <sup>ns</sup>
Roundup Ultra <sup>®</sup>	80,5 <sup>-</sup>	2,9 <sup>ns</sup>	158,0 <sup>+</sup>	2,63 <sup>ns</sup>	153,17 <sup>+</sup>	2,58 <sup>ns</sup>

cnds mL<sup>-1</sup> conídios por mL.

As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup>Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup> Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett;



**Fig. 1** Aspecto morfológico de células conidiogênicas (Esquerda) e hifas septadas (Direta) de *Metarhizium anisopliae*. Bars = 0,1 mm.



**Fig. 2** Aspecto morfológico de hifas septadas (Esquerda) e células conidiogênicas (Direta) de *Beauveria bassiana*. Bars = 0,1 mm.

**Tabela 04** Produção de conídios (cnds mL<sup>-1</sup>), Crescimento micelial (CM) dos isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* cultivados em diferentes formulações de glifosato.

<i>Beauveria bassiana</i>						
	ISO011		ISO26		ISO25	
SDA + herbicida	Conídios 10 <sup>8</sup> cnds mL	C. M (cm)	Conídios 10 <sup>8</sup> cnds. mL	C. M (cm)	Conídios 10 <sup>8</sup> cnds mL	C. M (cm)
Controle	17	3,83	33,83	3,68	18,17	3,68
PMG	<sup>ns</sup> 14,0	<sup>-</sup> 3,39	<sup>ns</sup> 17,67	<sup>ns</sup> 3,68	<sup>ns</sup> 16,67	<sup>ns</sup> 3,51
Roundup Original <sup>®</sup>	<sup>-</sup> 7,0	<sup>-</sup> 3,41	<sup>ns</sup> 25,67	<sup>ns</sup> 3,49	<sup>-</sup> 7,0	<sup>-</sup> 3,13
Roundup WG <sup>®</sup>	<sup>-</sup> 9,0	<sup>-</sup> 3,36	<sup>ns</sup> 16,83	<sup>ns</sup> 3,53	<sup>-</sup> 8,5	<sup>-</sup> 3,30
Roundup Ultra <sup>®</sup>	<sup>ns</sup> 18,0	<sup>-</sup> 3,35	<sup>ns</sup> 34,0	<sup>ns</sup> 3,75	<sup>ns</sup> 31,17	<sup>ns</sup> 3,5

cnds mL<sup>-1</sup> conídios por mL

As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup>Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup> Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett;

#### EFEITO DO GLIFOSATO NA GERMINAÇÃO DE *B. bassiana* e *M. anisopliae*

A molécula pura glifosato inibiu a germinação dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (**Tabela 05 e Tabela 06**) em todas as doses. Porém, houve crescimento dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* quando semeados em meio de cultura SDA.

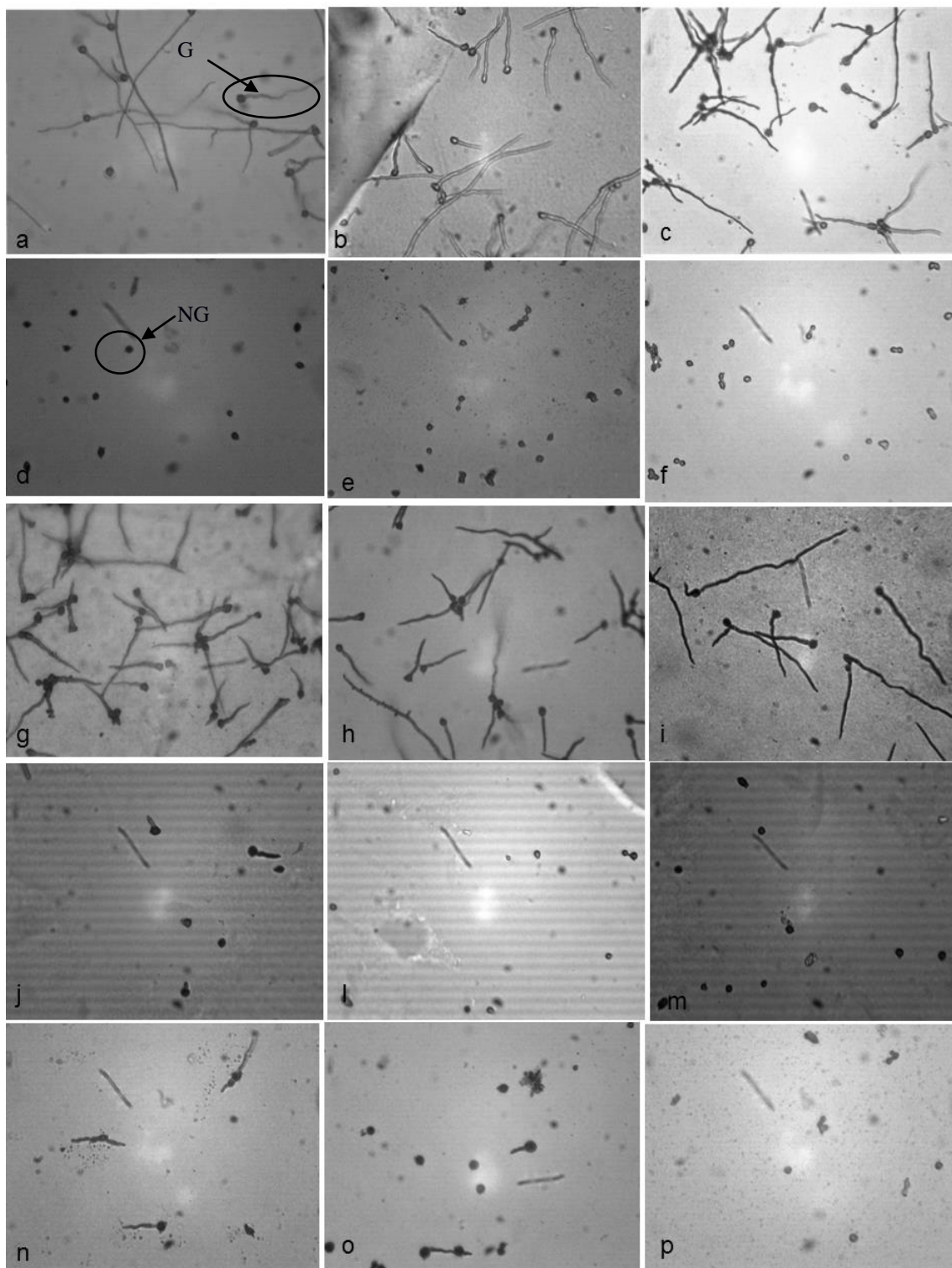
O comportamento dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi o mesmo para todos os isolados: o aumento na concentração dos herbidas provocou redução na germinação (**Tabela 05 e Tabela 06**).

A formulação do Roundup WG<sup>®</sup> inibiu a germinação do ISO02 em todas as doses e diminuindo a germinação até inibição nos isolados ISO01 e ISO03 (**Tabela 05**). Os isolados ISO11, ISO26 e ISO25 tiveram o mesmo comportamento para as doses de Roundup Original<sup>®</sup>, Roundup WG<sup>®</sup> e Roundup Ultra<sup>®</sup>, a uma maior dose das formulações comerciais a germinação era reduzida. (**Tabela 06**).

**Tabela 05** Germinação (Germ. %) e comprimento do tubo germinativo (T.G (mm)) dos isolados de *M. anisopliae* cultivados em diferentes formulações de glifosato.

<i>Metarhizium anisopliae</i>							
SDA + herbicida	Dose (mg L)	ISO01		ISO02		ISO03	
		Germ. %	T.G (µm)	Germ. %	T. G (µm)	Germ. %	T. G (µm)
Controle	-	91,73	0,0549	97,43	0,0347	87,23	0,0264
PMG	0,006 <sup>DR+50%</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
Roundup Original <sup>®</sup>	0,006 <sup>DR+50%</sup>	80,92 <sup>-</sup>	0,0325 <sup>-</sup>	88,20 <sup>-</sup>	0,0304 <sup>ns</sup>	81,65 <sup>ns</sup>	0,0537 <sup>+</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	86,81 <sup>-</sup>	0,0414 <sup>ns</sup>	90,73 <sup>-</sup>	0,0479 <sup>ns</sup>	77,74 <sup>-</sup>	0,0255 <sup>ns</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	76,48 <sup>-</sup>	0,0499 <sup>ns</sup>	88,02 <sup>-</sup>	0,0258 <sup>ns</sup>	75,03 <sup>-</sup>	0,0271 <sup>ns</sup>
Roundup WG <sup>®</sup>	0,006 <sup>DR+50%</sup>	34,63 <sup>-</sup>	0,0088 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	2,33 <sup>-</sup>	0,0159 <sup>ns</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	30,26 <sup>-</sup>	0,0148 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
Roundup Ultra <sup>®</sup>	0,006 <sup>DR+50%</sup>	81,61 <sup>-</sup>	0,0206 <sup>-</sup>	64,36 <sup>-</sup>	0,0269 <sup>ns</sup>	36,83 <sup>-</sup>	0,0134 <sup>ns</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	59,80 <sup>-</sup>	0,0159 <sup>-</sup>	11,79 <sup>-</sup>	0,0113 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	20,02 <sup>-</sup>	0,0090 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>

<sup>DR+50%</sup> subdose, <sup>DR</sup> dose média usual recomendada, <sup>DR+100%</sup> sobredose. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup> Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett;



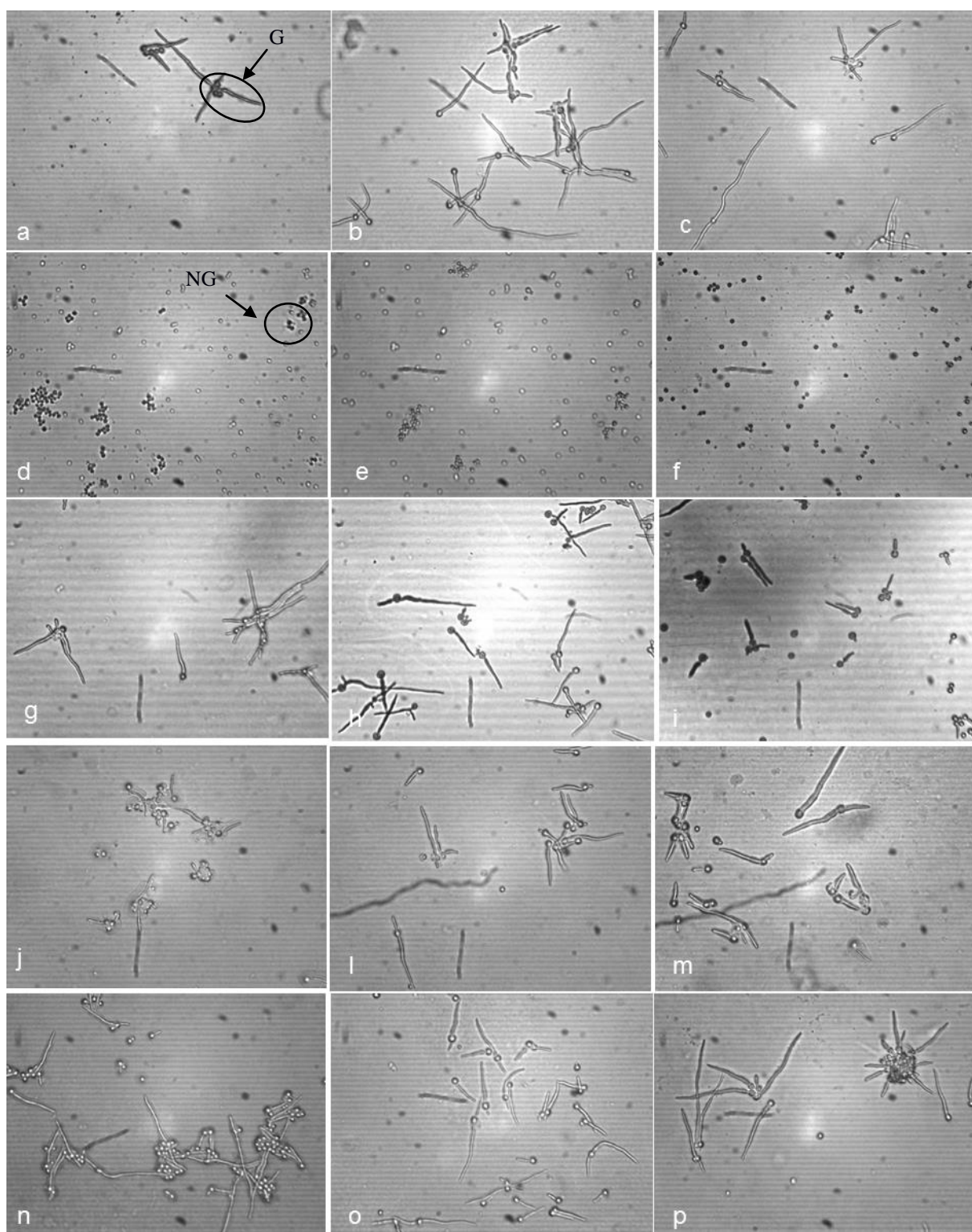
**Fig 03** Conídios germinados (G) e não germinados (NG) - tratamento controle (a-ISO01, b-ISO02, c-ISO03); PMG (d-ISO01, e-ISO02, f-ISO03); Roundup Original® (g-ISO01, h-ISO02, i-ISO03); Roundup WG® (j-ISO01, l-ISO02, m-ISO03); Roundup Ultra® (n-ISO01, o-ISO02, p-ISO03)

**Tabela 06** Germinação e cumprimento do tubo germinativo dos isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* cultivados em diferentes formulações de glifosato.

<i>Beauveria bassiana</i>							
		ISO011		ISO26		ISO25	
SDA + herbicida	Dose (mg L)	Germ.	T. G (µm)	Germ.	T. G (µm)	Germ.	T. G (µm)
Controle	-	70,04	0,0139	92,97	0,0188	80,97	0,0201
PMG	0,006 <sup>DR+50%</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>	0 <sup>-</sup>
Roundup Original <sup>®</sup>	0,006 <sup>DR+50%</sup>	81,03 <sup>+</sup>	0,0246 <sup>ns</sup>	94,44 <sup>ns</sup>	0,0184 <sup>ns</sup>	95,49 <sup>ns</sup>	0,0232 <sup>ns</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	46,61 <sup>-</sup>	0,0116 <sup>ns</sup>	88,44 <sup>ns</sup>	0,0207 <sup>ns</sup>	76,90 <sup>ns</sup>	0,0107 <sup>ns</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	17,32 <sup>-</sup>	0,0197 <sup>ns</sup>	74,28 <sup>-</sup>	0,0220 <sup>ns</sup>	27,43 <sup>-</sup>	0,0175 <sup>ns</sup>
Roundup WG <sup>®</sup>	0,006 <sup>DR+50%</sup>	70,04 <sup>ns</sup>	0,0129 <sup>ns</sup>	80,34 <sup>-</sup>	0,0190 <sup>ns</sup>	88,17 <sup>ns</sup>	0,0243 <sup>ns</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	40,90 <sup>-</sup>	0,0110 <sup>ns</sup>	75,40 <sup>-</sup>	0,0189 <sup>ns</sup>	87,51 <sup>ns</sup>	0,0185 <sup>ns</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	34,54 <sup>-</sup>	0,0147 <sup>ns</sup>	70,04 <sup>-</sup>	0,0151 <sup>ns</sup>	70,04 <sup>ns</sup>	0,0119 <sup>-</sup>
Roundup Ultra <sup>®</sup>	0,006 <sup>DR+50%</sup>	49,04 <sup>-</sup>	0,0178 <sup>ns</sup>	80,49 <sup>-</sup>	0,139 <sup>ns</sup>	67,49 <sup>ns</sup>	0,0255 <sup>ns</sup>
	0,012 <sup>DR</sup>	27,85 <sup>-</sup>	0,0112 <sup>ns</sup>	49,33 <sup>-</sup>	0,0162 <sup>ns</sup>	56,18 <sup>ns</sup>	0,0139 <sup>ns</sup>
	0,024 <sup>DR+100%</sup>	9,94 <sup>-</sup>	0,089 <sup>ns</sup>	22,90 <sup>-</sup>	0,0068 <sup>-</sup>	32,25 <sup>-</sup>	0,00952 <sup>-</sup>

<sup>DR+50%</sup> subdose, <sup>DR</sup> dose média usual recomendada, <sup>DR+100%</sup> sobredose. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup> Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett;





**Fig 04** Conídios germinados (G) e não germinados (NG) - tratamento controle (a-ISO11, b-ISO26, c-ISO25); PMG (d-ISO11, e-ISO26, f-ISO25); Roundup Original® (g-ISO11, h-ISO26, i-ISO25); Roundup WG® (j-ISO11, l-ISO26, m-ISO25); Roundup Ultra® (n-ISO11, o-ISO26, p-ISO25)

## DISCUSSÃO

Os efeitos observados pelas diferentes formulações do glifosato sobre o crescimento micelial, produção de conídios e germinação evidenciam variações quanto à fisiologia dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* e também entre seus isolados.

A diferença no efeito provocado pelo PMG em *M. anisopliae*, ISO01, redução da produção de conídios e em *B. bassiana*, ISO11, redução no crescimento micelial, pode estar relacionado com as variações na fisiologia dos dois fungos. O efeito inibitório na produção de conídios e crescimento micelial possivelmente está relacionado com a interferência do PMG na enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), dependente da rota do chiquímato. O ácido chiquímico é um precursor para aminoácidos essenciais como fenilalanina, tirosina e triptofano, e outros metabolitos em microorganismos e plantas. (HINCHEE *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2010; GHOSH *et al.*, 2012).

A ausência de efeitos inibitórios nos isolados ISO03 e ISO02 de *M. anisopliae* para a maioria das formulações pode estar relacionado com os diferentes potenciais dos isolados na produção de enzimas extracelulares. As hifas dos fungos filamentosos excretam um grande número de enzimas, incluindo proteases, quitinases, chitobiases, lipases, lipoxigenases e outras enzimas hidrolíticas degradando moléculas do meio e fornecendo nutrientes ao fungo (BARRANCO-FLORIDO *et al.*, 2002). Isolados de diferentes fontes do gênero *Cladosporium* também diferiram quanto ao potencial enzimático, sugerindo a uma variabilidade genética entre os isolados (CUNHA *et al.*, 2013).

Quando o isolado ISO01 cresceu em meio de culturas com Roundup Original® e Roundup Ultra® o efeito de redução na produção de conídios foi diminuído. Os adjuvantes presentes nas formulações comerciais do glifosato podem ter reduzido esse efeito como fonte de nutrientes. Nos isolados ISO02 e ISO03 o efeito dos adjuvantes do Roundup Ultra® pode ter estimulado a produção de conídios. Porém, o contrário foi observado nos isolados de *B. bassiana* ISO11 e ISO25, os adjuvantes podem ter potencializado o efeito do glifosato e este passou a inibir também a produção de conídios. Em estirpes de *Bradyrhizobium* o PMG afetou da rota do chiquímato em três de quatro estirpes avaliada, porém a adição de aminoácido aromático reduziu o efeito tóxico da molécula em todas as estirpes testadas (SANTOS *et al.*, 2005).

Na avaliação de comportamento de crescimento e produção de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* a natureza da formulação, sal de isopropilamina ou de amônio,

presente nas formulações comerciais, não esteve diretamente relacionado com o grau de toxidez, provavelmente este efeito pode ser resultado do meio de cultura (enriquecido com nutrientes) e a baixa concentração de herbicida utilizada nos ensaios. Benefício do glifosato em baixas concentrações também foi observado na resposta quadrática de crescimento para as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (MALTY *et al.*, 2006).

Nos resultados do ensaio de germinação a maior inibição dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi causada pela molécula pura de glifosato. A quebra do efeito fungistático provocado pelo PMG sobre os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi provocada pelos nutrientes presentes no meio de cultura SDA. A germinação dos conídios é ativada por pistas ambientais que conduzem o esporo de repouso, hipometabolismo, à germinação (MOIR, 2006). Meios de cultura mais ricos em nutrientes oferecem melhores condições para a germinação de fungos enquanto meios nutricionalmente pobres afetam negativamente a viabilidade dos fungos (ISKANDAROV *et al.*, 2006).

O aumento das doses dos herbicidas no teste de germinação acentuou as diferenças de comportamento entre os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Os isolados de *M. anisopliae* foram mais susceptíveis. Os adjuvantes das formulações comerciais podem ter causado a remoção ou o enfraquecimento da parede celular, permitindo a penetração do herbicida glifosato, o que provocou inibição ou redução da germinação e crescimento do tubo germinativo. Sugere-se que o aumento das doses do herbicida inibiu a retomada da síntese proteica, de maneira proporcional. Após o inchaço, evento morfológico provocado pela entrada de água, o conídio inicia a retomada da síntese protéica (MOIR, 2006). Em estudos com *Aspergillus nidulans* feitos tóxicos do Roundup® (R450) ocorreu em doses muito mais baixas da aplicação recomendada (NICOLAS *et al.*, 2016). Aplicações de três inseticidas neonicotinóides, acetamiprid (Saurus®200 PS), imidacloprid (Confidor® 700 GrDA) e thiamethoxam® (Actara 250 WG) em três doses (RM = recomendação média para campo, 0,7 RM e 1,3 RM), não afetaram a germinação dos conídios de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* sp. com exceção do acetamiprid na maior dose aplicada (1,3 RM) (NEVES *et al.*, 2001).

Os isolados de *M. anisopliae* foram os mais susceptíveis no ensaio da germinação, com maior número de inibição, variando com as formulações e concentrações. A existência da via shiquimato em fungos não significa necessariamente que o glifosato funcione como nas plantas. EPSPS de diferentes organismos foram divididos em duas classes de acordo com a sensibilidade intrínseca dos herbicidas a base de glifosato. Classe I (sensível aos herbicidas a



base de glifosato) inclui EPSPS de todas as plantas e de algumas bactérias, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, enquanto EPSPS encontrado em algumas outras espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Agrobacterium* sp. a estirpe CP4 pertence à classe II (tolerante aos herbicidas a base de glifosato) (PRIESTMAN *et al.*, 2005; FUNKE *et al.* 2009). O fato de que as porcentagens de germinação e crescimento o tubo germinativo na presença de diferentes formulações de glifosato para os isolados de *B. bassiana* sugere, que o glifosato inibe apenas parcialmente a enzima EPSPS. Taxas de sobrevivência na presença de Roundup®, para a cepa CV125 de *Aspergillus nidulans* foram às mesmas em meio rico (contendo aminoácidos) e meio mínimo (desprovido de aminoácidos) indicando que o glifosato não inibe ou inibe apenas parcialmente a enzima EPSPS (NICOLAS *et al.*, 2016).

## CONCLUSÃO

Os diferentes efeitos na interação do glifosato com fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* mostrou *M. anisopliae* mais sensível e *B. bassiana* mais tolerante ao uso concomitante com o glifosato. Assim, a seletividade de agrotóxicos para programas de controle biológico microbiano auxilia na escolha do produto que menos afete a atividade inseticida dos fungos entomopatogênicos.

## REFERENCIAS

- CASTRO, M. J. L.; OJEDA, C.; CIRELLI, A. F. Advances in surfactants for agrochemicals. **Environmental chemistry letters**, v. 12, n. 1, p. 85-95, 2014.
- CHOU, D. K. *et al.* Effects of Tween 20® and Tween 80® on the stability of Albutropin during agitation. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 94, n. 6, p. 1368-1381, 2005.
- CUNHA, M. N. C *et al.* Production of enzymes by filamentous fungus using sugarcane and sugarcane bagasse as substrate. **Revista Brasileira de Biociencias**, v. 11, n. 2, 2013.
- FARIA, M.R.; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

FUNKE, Todd et al. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97→ Ile and Pro101→ Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9854-9860, 2009.

GHOSH, S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production of shikimic acid. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1425-1431, 2012.

HINCHEE, M. A. W. *et al.* Herbicide-tolerant crops. In: KUNG, S.; WU, R. (Eds.). Transgenic plants. San Diego: Academic Press, 1993. p. 243-263.

ISKANDAROV, U. S.; GUZALOVA, A. G.; DAVRANOV, K. D. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 72-76, 2006.

KOCH, K.; BHUSHAN, B.; BARTHLOTT, W. Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. **Soft Matter**, v. 4, n. 10, p. 1943-1963, 2008.

LUZ, C.; FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. **Mycopathologia**, v. 138, n. 3, p. 117-125, 1997.

NEVES, P. M. *et al.* Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 263-268, 2001.

NICOLAS, V; OESTREICHER, N; VÉLOT, C. Multiple effects of a commercial Roundup® formulation on the soil filamentous fungus *Aspergillus nidulans* at low doses: evidence of an unexpected impact on energetic metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 14393-14404, 2016.

MALTY, J.S.; SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p.285-291, 2006.

MOIR, A. How do spores germinate?. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 3, p. 526-530, 2006.

OLIVEIRA, D. G. P. *et al.* A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

PRIESTMAN, M. A. *et al.* 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS letters**, v. 579, n. 3, p. 728-732, 2005.

RIECHERS, Dean E. *et al.* Surfactant-increased glyphosate uptake into plasma membrane vesicles isolated from common lambsquarters leaves. **Plant physiology**, v. 105, n. 4, p. 1419-1425, 1994.

ROSA, D. D. *et al.* Efeito de herbicidas sobre agentes fitopatogênicos. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 379-383, 2010.

RODRIGUES, N. R.; SOUZA, A. P. F. Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 4, p. 723-730, 2018.

SANTOS, J.B. *et al.* Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, v. 24, n. 6, p. 543-547, 2005.

SANTOS, V. L.; LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents—identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1001-1006, 2004.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.

WESSELS, J. G. H. hydrophobins: proteins that change the nature of a fungal surface. **Advances in Microbial Physiology**, v. 38, p. 1-45, 1997



## CAPÍTULO II

### **PATOGENICIDADE DE *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, CULTIVADOS EM MEIO COM GLIFOSATO, A *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**RESUMO** A ação de fungos entomopatogênicos, como agentes de controle biológico, pode ser afetada por agrotóxicos, causando inibição de crescimento, conidiogênese, ou redução da virulência. Este trabalho teve por objetivo avaliar diferentes isolados *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) cultivados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) com diferentes formulações do herbicida glifosato, visando avaliar a variação da patogenicidade dos isolados em função da natureza química do produto. Cento e setenta e cinco lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas da criação da Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, estado de Minas Gerais, e separadas em grupos de sete por tratamento. Cada tratamento recebeu a aplicação de 0,4 µL das suspensões dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, cultivados em meio de cultura SDA com diferentes formulações de glifosato na concentração de  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>, diretamente sobre o dorso das lagartas. Todos os isolados de *M. anisopliae* cultivados em meio de cultura com diferentes formulações de glifosato, aplicados na concentração  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> mostraram-se patogênicos a *A. gemmatalis*. O isolado ISO 11, em meio de cultura com a molécula pura de glifosato permitiu que três lagartas se desenvolvessem até a fase adulta e uma lagarta atingiu o 4º instar. Os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* mostraram-se eficientes no controle da *A. gemmatalis*.

**Palavras chaves:** Agricultura sustentável, Controle Biológico, Herbicidas

## CHAPTER II

### **PATHOGENESIS OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae*, CULTIVATED IN CULTURE MEDIUM WITH GLYPHOSATE TO *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**ABSTRACT** The action of entomopathogenic fungi, as a biological control agent, can be affected by phytosanitary products, causing inhibition of growth, conidiogenesis, or diminishing their virulence. The objective of this work was to evaluate different *Beauveria*

*bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Nectriaceae) isolates in the control of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). The results of the experiment were carried out using a different formulation of the glyphosate herbicide, with the aim of evaluating the variation of the pathogenicity of the isolates as a function of the chemical nature of the product. One hundred and seventy-one caterpillars of *A. gemmatalis*, obtained from the creation of Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas-MG, were grouped into 7 caterpillars per treatment and received the application of 0.4 µL of suspensions of fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*, cultured in Sabouraud Agar Dextrose (SDA) culture medium with different glyphosate formulations at the concentration of  $10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> on the dorsol. All isolates of *M. anisopliae* cultivated in culture medium with different formulations of glyphosate, applied in the concentration  $10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> were pathogenic to *A. gemmatalis*. The ISO11, in culture medium with PMG allowed three caterpillars to develop until adulthood and one caterpillar reached the 4th instar. The isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* show efficient control of *A. gemmatalis*.

**Key words:** Sustainable Agriculture, Biological Control, herbicides

## INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos atuam na regulação natural de insetos causando declínio das populações hospedeiras por epizootias (VEGA et al., 2009; MEYLING; HAJEK, 2010). *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) (Hypocreales: Nectriaceae) e *Beauveria bassiana* (Vuillemin) (Hypocreales: Clavicipitaceae) são utilizados como alternativas aos agrotóxicos e tem atividade inseticida contra uma ampla gama de hospedeiros (LORD, 2005, SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

A ação dos fungos entomopatogênicos, como agentes de controle biológico, pode ser afetada pelos agrotóxicos, causando inibição do crescimento vegetativo e da conidiogênese, ou provocar mutações genéticas, alterando sua virulência (ALVES et al., 1998).

Um dos agrotóxicos que se destaca por maior volume comercializado no Brasil e no mundo é o glifosato [n- (fosfometil)glicina] (AGUIAR et al., 2016). Herbicida não seletivo e com amplo espectro de ação, possui perspectivas de aumento do consumo devido ao maior plantio de culturas resistentes à ele. Entre as culturas modificadas geneticamente para resistência ao glifosato e com maior área de plantios no Brasil, destaca a soja, *Glycine max*, (SIQUEIRA et al., 2004).

Durante todo o ciclo, a soja é atacada por várias pragas, sendo uma das mais importantes *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). O ciclo de vida de *A. gemmatilis* dura, em média, 30 dias e pode, em um único ciclo da cultura da soja, desenvolver três gerações (PRAÇA et al., 2006).

A *A. gemmatilis* é controlada em programas de controle biológico, com sucesso, pelo *Baculovirus anticarsia*. Outro microrganismo muito eficiente utilizado contra a lagarta da soja é *Bacillus thuringiensis*, subespécie *kurstaki*. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria que age rapidamente, após ser ingerida pelas lagartas (KNAACK; FIUZA, 2005).

Devido à ampla gama de hospedeiros e a variabilidade genética com diferentes níveis de virulência (ZIMMERMANN, 2007a; 2007b) *B. bassiana* e *M. anisopliae* possuem grande possibilidade de utilização no controle de pragas da soja, incluindo *A. gemmatilis*.

Este trabalho teve por objetivo avaliar diferentes isolados *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle de *A. gemmatilis* cultivados em meio SDA adicionados de diferentes formulações do herbicida glifosato, visando avaliar a variação da patogenicidade dos isolados em função da natureza química do produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Insetos e no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, no município de Diamantina, Minas Gerais.

### OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *B. bassiana* E *M. anisopliae*

Os isolados fúngicos foram obtidos da linhagem WP PL63 de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) por meio do produto comercial Boveril<sup>®</sup> WP PL63 e da linhagem WP E9 de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Nectriaceae) por meio do produto comercial Metarril<sup>®</sup> WP E9, ambos comercializados pela empresa Koppert Biological Systems. De cada produto comercial foi retirado 0,1g do pó molhável e suspenso em 10mL de solução aquosa do espalhante adesivo Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%) esterilizada. Após agitação a suspensão foi diluída em solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 (0,01%) esterilizada até obtenção  $10^2$  conídios mL<sup>-1</sup>, quantificada utilizando uma câmara Neubauer em microscópio. Em seguida, 100 µL da suspensão de conídios de cada fungo foi espalhada em 03 placas de Petri (11 cm) em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA). As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de incubação, três fragmentos de micélio (5mm) foram retirados de colônias isoladas de *B. bassiana* e identificados como ISO11, ISO26 e ISO25 e de colônias isoladas de *M. Anisopliae* e identificados como ISO01, ISO02 e ISO03. Os seis isolados foram repicados para o mesmo meio de SDA e incubados por mais 15 dias nas mesmas condições. A partir dessas, novas culturas dos seis isolados de 15 dias de idades foram produzidas nas mesmas condições para realização do ensaio.

### CRESCIMENTO DE *B. bassiana* E *M. Anisopliae* EM MEIO DE CULTURA COM GLIFOSATO

Quatro formulações de glifosato (tabela 01) foram incluídas em meio de cultura para o crescimento das culturas dos isolados. As soluções dos herbicidas foram preparadas em 10 mL de água destilada e esterilizada por filtração com o filtro Millipore 0,22 µm. As soluções de herbicidas foram adicionadas ao meio de cultura SDA fundente nas doses apresentadas na tabela 01. A dose dos herbicidas foi calculada de acordo com o diâmetro médio das placas de Petri. Foram vertidos 20 mL do meio fundente para placas de Petri de 11



cm de diametro com auxilio da pipeta tipo Kipp. Um disco do meio de cultura dos isolados (3 mm) foi transferido para o meio com o herbicida, após arrefecimento e incubados a 25 °C por 15 dias com fotoperíodo de 12 horas. Dessas placas foram obtidas as suspensões de conídios, transferindo-se para um eppendorf esterilizado um disco de 5mm de micélio de cada cultura de isolado com 0,5 mL de solução esterilizada de Tween® 80 (0,01%), homogeneizadas com agitação por 1 min, e sua quantidade foi padronizada para  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> com auxílio da câmara Neubauer em microscópio.

**Tabela 01** Denominações dos produtos, composição e doses de glifosato utilizados nos ensaios.

PRODUTO	COMPOSIÇÃO	DOSES
PMG	N- (fosfonometil) glicina	68,4 mg L <sup>-1</sup>
Molécula Pura Glifosato		
Roundup Original®	Sal de Isopropilamina 360 g L equivalente ácido	190 mg L <sup>-1</sup>
Roundup WG®	Sal de Amônio 720 g kg equivalente ácido	95 mg L <sup>-1</sup>
Roundup Ultra®	Sal de Amônio 650 g kg equivalente ácido	105 mg L <sup>-1</sup>

#### VIABILIDADE DOS ISOLADOS DE *B. bassiana* E *M. anisopliae*

Antes de avaliar a patogenicidade dos fungos a *A. gemmatilis* foi determinada a viabilidade dos conídios, por meio da técnica de microcultivo e exame direto em lâminas de microscopia. Foram feitas 5 mL de suspensões dos conídios obtidos de cada colônias crescidas em SDA com as formulações do glifosato, na concentração de  $10^6$ . Previamente, foram colocados três discos de 9 mm de meio de agar na face superior das lâminas. Sobre o meio de cultura foi semeado, em cada disco, 50 µL da suspensão de conídios. As lâminas foram acondicionadas, individualmente, em câmara úmida (placa de Petri esterilizada com um disco de papel filtro umedecido) para manter um microclima favorável para germinação dos conídios. As placas foram incubadas a 25 °C por 20 horas com fotoperíodo de 12 horas (LUZ; FARGUES, 1997). Após o periodo de 20 h, foi colocada uma gota do corante lactofenol azul-de-algodão sobre a área do círculo, para deter a germinação e facilitar a visualização do conídio. Em seguida, foi feita a observação, com auxilio microscópio de óptico (aumento de 400x) de 150 conídios germinados e não germinados estabelecendo-se depois a porcentagem de germinação. Cada lâmina correspondeu a uma repetição e para cada tratamento fez-se três discos de ágar-ágar.

## PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *B. bassiana* E *M. anisopliae* A *A. gemmatilis*

Lagartas de terceiro instar de *A. gemmatilis*, obtidas da criação da Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, estado de Minas Gerais, foram tratadas topicamente com a deposição de 0,4 µL das suspensões dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* na concentração de  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>. O controle foi tratado com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80<sup>®</sup> a 0,01%. As aplicações das soluções fúngicas foram feitas no dorso dos insetos com um micropipetador (DUBOVSKIY *et al.*, 2013). Cento e setenta e cinco lagartas de *A. gemmatilis*, obtidas da criação da Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, estado de Minas Gerais, foram separadas em grupos de três lagartas por placa e receberam a aplicação da suspensão de conídios. Durante todo o experimento as lagartas foram alimentadas com dieta artificial fornecida pela Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, estado de Minas Gerais. O ensaio foi realizado a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Diariamente realizou-se observações de mortalidade das lagartas de *A. gemmatilis*. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey, a 5% de significância.

Lagartas mortas foram transferidas diretamente para placas de Petri contendo algodão úmido (câmara úmida) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por dez dias, para confirmar a mortalidade causada pelos patógenos através do crescimento micelial e colonização do fungo.

## RESULTADOS

Todos os isolados de *M. anisopliae* cultivados em meio de cultura com diferentes formulações de glifosato, aplicados na concentração  $1 \times 10^8$  conídios mL mostraram-se patogênicos a *A. gemmatilis* (**Tabela 02**). Todos os isolados de *M. anisopliae* obtiveram o mesmo tempo letal para eliminar mais de 50% das *A. gemmatilis* (**Tabela 02**). A viabilidade dos conídios dos isolados de *M. anisopliae* variou de 80,47% a 90,49% (**Tabela 02**).

A patogenicidade dos isolados de *B. bassiana* do ISO11 diferiu dos ISO26 e ISO25, em meio de cultura com a molécula pura do glifosato, PMG. O ISO 11, em meio de cultura com PMG permitiu que três lagartas se desenvolvessem até a fase adulta e uma lagarta atingiu o 4º instar (**Tabela 03**). O tempo letal para eliminar mais de 50% das *A. gemmatilis* foi o mesmo para todos os isolados de *B. bassiana* (**Tabela 03**). A menor viabilidade de conídios foi do ISO11 48,91%, cultivado em meio de cultura como o PMG (**Tabela 03**). Para todos os casos que envolveram mortalidade, o agente causal foi confirmado.

**Tabela 02** - Taxa de mortalidade (Morte%), Tempo letal – Dose letal mediana (TL/DL50), das lagartas de *A. gemmatilis* e expostas aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* cultivados em diferentes formulações de glifosato e viabilidade de conídios (Viab %) .

<i>Metarhizium anisopliae</i>									
	ISO01			ISO02			ISO03		
SDA + herbicida	Morte %	T L (dias)	Viab. %	Morte %	T L (dias)	Viab.	Morte %	T L (dias)	Viab.
Controle	0	-	-	0	-	-	0	-	-
PMG	7 a	5 a	89,72	7 a	5 a	88,07	7 a	5 a	80,47
Roundup Original®	7 a	4,5 a	90,49	7 a	5 a	89	7 a	4,5 a	82,72
Roundup WG®	7 a	5 a	88	7 a	5,5 a	82,5	7 a	4,5 a	83,3
Roundup Ultra®	7 a	4,5 a	83,51	7 a	5 a	82,51	7 a	4,5 a	81,25
<i>Beauveria bassiana</i>									
	ISO011			ISO26			ISO25		
SDA + herbicida	Morte %	T L (dias)	Viab. %	Morte %	T L (dias)	Viab.	Morte %	T L (dias)	Viab.
PMG	4 b	6 a	48,91	7 a	5 a	83,7	7 a	5 a	78,72
Roundup Original®	7 a	4,5 a	85	7 a	5 a	82	7 a	4,5 a	84
Roundup WG®	7 a	5 a	85,77	7 a	5,5 a	81,3	7 a	4,5 a	81,92
Roundup Ultra®	7 a	4,5 a	86,81	7 a	5 a	85,48	7 a	4,5 a	83,22

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

## DISCUSSÃO

*Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* sobreviveram à exposição de diferentes formulações do glifosato e foram capazes de causar a morte de *A. gemmatilis* quando cultivados em meio de cultura com as fórmulas comerciais e a molécula pura de glifosato.

A capacidade entomopatogênica de *M. anisopliae* e *B. bassiana* não variou conforme os isolados e nem por meio da ação de diferentes formulações comerciais do glifosato, Roundup Original®, Roundup WG®, Roundup Ultra®, O isolado E9 de *M. anisopliae* e o isolado IBCB66 de *B. bassiana* foram cultivados em meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA) com o produto comercial Glifosato®. O herbicida Glifosato® foi classificado como compatível com *M. anisopliae* apenas na dose recomendada em pré-emergência (DRPE), 3L ha- e moderadamente tóxico na dose recomendada em pós-emergência (DRPO) 6,0L ha-. *Beauveria bassiana* demonstrou ser compatível somente nas doses DRPE e DRPE + 50 % (BOTELHO; MONTEIRO, 2011).

O tempo letal para eliminar mais de 50% das *A. gemmatalis* foi semelhante entre os isolados de *M. anisopliae* e *B. Bassiana*. O tempo letal pode variar conforme idade, tamanho e espécie do hospedeiro e quanto à linhagem do fungo entomopatogênico (ZIMMERMANN, 2007a; 2007b). Estudo envolvendo duas cepas de *B. Bassiana* (NI8 e KUDSC) para o controle de *Megacopta cribraria* (F.) (Heteroptera: Plataspidae) registrou a mortalidade mais precoce na concentração  $10^7$  conídios por mL em dois e três dias após o tratamento em adultos jovens, enquanto insetos mais velhos tratados com cepas NI8 e KUDSC começaram a exibir mortalidade em um e dois dias após o tratamento na mesma concentração e 8 dias para a menor concentração testada,  $10^4$  conídios mL (PORTILLA et al., 2016).

A menor porcentagem de conídios viáveis explica a diferença entre o número de lagartas mortas quando o isolado ISO11 é cultivado com o PMG. A viabilidade de conídios é principal parâmetro utilizado para determinar os efeitos de vários fatores ambientais nos fungos entomopatogênicos (SHAH; PELL, 2003; SHAHID *et al.*, 2012).

A patogenicidade dos fungos cultivados em meio com herbicidas é conhecida por variar de acordo com isolados fúngicos e concentrações de ingredientes ativos (BORISADE; FALADE 2016). A baixa variação encontrada neste trabalho pode ser atribuída ao fato dos isolados já serem pré selecionados para o controle biológico.

## CONCLUSÃO

Os isolados de *M. anisopliae* e *B. Bassiana* cultivados em meio SDA com diferentes formulações de glifosato causaram a morte em mais de 50% da população de *A. gemmatalis*.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M. *et al.* Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 185, p. 94-101, 2016.
- ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R. *et al.* Side-effects of pesticides on the generalist endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10064, 2017.
- ALVES, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba. FEALQ, 1998. 1163p.

BATISTA FILHO, A. *et al.* Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 70, n. 1, p. 61-67, 2003.

BORISADE, O. A.; OSO, A. A.; FALADE, M. J. Interactions of some registered agrochemicals in Nigerian farming systems with entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria farinose*. **Ife Journal of Science**, v. 18, n. 4, p. 949-961, 2016.

BOTELHO, A. A. A.; MONTEIRO, A. C. Sensitivity of entomopathogenic fungi to pesticides used in management of sugarcane. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p. 361-369, 2011.

DUBOVSKIY, I. M. *et al.* Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60248, 2013.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. **Journal of invertebrate pathology**, v. 89, n. 1, p. 19-29, 2005.

LUZ, C.; FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. **Mycopathologia**, v. 138, n. 3, p. 117-125, 1997.

KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia Mariana. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. **Mycological Research**, v. 110, n. 2, p. 188-195, 2006.

PRAÇA, L. B.; MORAES, S.; MONNERAT, R. G. *Anticarsia gennatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) biologia, amostragem e métodos de controle. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Documentos, 2006.

PORTILLA, M. *et al.* Estimation of median lethal concentration of three isolates of *Beauveria bassiana* for control of *Megacopta cribraria* (Heteroptera: Plataspidae) bioassayed on solid *Lygus* spp. Diet. **Insects**, v. 7, n. 3, p. 31, 2016.

SIQUEIRA, J. O. *et al.* Interferências no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 1, p. 11-81, 2004.

SHAH, P. A.; PELL, J. K.. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 413-423, 2003.

SHAHID, A. A. *et al.* Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 1, p. 21-42, 2012.

VEGA, F. E. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007b.

### CAPÍTULO III

#### COMPATIBILIDADE DO PARASITOIDE *Palmistichus elaeisis* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) COM OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae*

**RESUMO** Técnicas que aumentam a diversidade de inimigos naturais no agroecossistema como a utilização simultânea de parasitoides e fungos entomopatogênicos pode ser uma alternativa para ampliar o controle sustentável de insetos pragas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* com o parasitoide *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) estudando os efeitos na reprodução dos parasitoides. Vinte e uma pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) parasitadas foram mergulhadas nas suspensões de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e expostas ao parasitismo por seis fêmeas de *P. elaeisis*. Outras 21 pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), com menos de 24 horas de idade, foram mergulhadas nas suspensões de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e expostas ao parasitismo por seis fêmeas de *P. elaeisis*. Foram avaliadas as taxas de parasitismo, ciclo ovo-adulto, número de fêmeas emergidas, razão sexual, longevidade e a capacidade de um novo parasitismo das fêmeas que caminharam sobre as pupas expostas as suspensões fúngicas. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não afetaram o desenvolvimento do parasitoide quando entraram em contato com pupas já parasitadas. O *B. bassiana* repeliu fêmeas de *P. elaeisis* impedindo a ação do seu parasitismo sobre pupas *T. molitor* em ambas as concentrações testadas. Porém, não impediu que as fêmeas de *P. elaeisis* parasitassem um hospedeiro adequado para o desenvolvimento de sua prole. A longevidade das fêmeas de *P. elaeisis* não sofreu alteração com a presença dos fungos *B. Bassiana* e *M. anisopliae* em nenhum dos tratamentos. Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram compatíveis com o *P. elaeisis*, assim, podem ser utilizadas em conjunto para suprimir insetos pragas.

**Palavras-chave:** Agroecossistema, biodiversidade, controle biológico, endoparasitoide, interação.

### CHAPTER III

#### **PARASITOID COMPATIBILITY *Palmistichus elaeisis* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) WITH ENTOMOPATHOGENIC FUNGI *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae***

**ABSTRACT** Techniques that increase the diversity of natural enemies in the agroecosystem as the simultaneous use of parasitoids and entomopathogenic fungi can be an alternative to extend the sustainable control of insect pests. The objective of this work was to evaluate the compatibility of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Nectriaceae) with the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) studying the effects on the reproduction of parasitoids. Twenty one parasitized pupae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) were immersed in the suspensions of *B. bassiana* and *M. anisopliae* conidia and exposed to parasitism by six females of *P. elaeisis*. Another 21 pupae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) less than 24 hours old were immersed in the suspensions of *B. bassiana* and *M. anisopliae* conidia and exposed to parasitism by six females of *P. elaeisis*. The rate of parasitism, egg-adult cycle, number of emerged females, sex ratio, longevity and the capacity of a new parasitism of the females that walked on the pupae exposed to the fungal suspensions were evaluated. The fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* did not affect the development of the parasitoid when they came in contact with pupae already parasitized. *Beauveria bassiana* repelled females of *P. elaeisis* preventing the action of their parasitism on *T. molitor* pupae at both concentrations tested. However, it did not prevent the females of *P. elaeisis* from parasitizing a suitable host for the development of their offspring. The longevity of *P. elaeisis* females did not change with *B. bassiana* and *M. anisopliae* fungi in any of the treatments. However, there was a reduction in the survival of *P. elaeisis* females. The entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* were compatible with *P. elaeisis*, so they can be used together to suppress pest insects.

**Key words:** Agroecosystem, biodiversity, biological control, endoparasitoid, interaction.



## INTRODUÇÃO

Com baixo impacto ambiental, o controle biológico é uma ferramenta do MIP que visa manter o agroecossistema mais próximo possível de um equilíbrio biológico, onde a densidade populacional da praga se mantém sempre abaixo do nível de dano econômico (ZANUNCIO *et al.* 2018). O controle biológico engloba o uso de predadores, parasitoides ou patógenos, chamados inimigos naturais para suprimir as populações de pragas (PARRA *et al.*, 2002; SOARES *et al.* 2011).

Os parasitoides de insetos são amplamente utilizados em programas de controle biológico (COLINET; BOIVIN 2011) com casos de sucesso no Brasil (PARRA, 2014). Metade da área de cana-de-açúcar, no Brasil, mais de 8 milhões hectares é tratada com o controle biológico dos parasitoides *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma galloi* (Zucchi) (Hymenoptera, Trichogrammatidae) no controle da praga *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) (PARRA *et al.*, 2011, 2014). Mais de sessenta mil hectares de lavoura de milho são tratadas com liberações dos parasitoides *Trichogramma atopovirilia* (Oatman and Platner) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) no controle da *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Trichogramma pretiosum* (Riley) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) no controle da *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)

*Palmistichus elaeisis* (Delvare & LaSalle) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide, generalista, gregário e idiobionte de pupas, sendo promissor para ser utilizado no controle de lepidópteros desfolhadores (ZANUNCIO *et al.* 2009). Este parasitoide já foi registado no Brasil nos hospedeiros *Eupelesopterus involuta* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Euselasia eucerus* (Lepidoptera: Riodinidae), *Sabulodes* sp. (Lepidoptera: Geometridae) e *Thyrintina arnobia* (Stoll) e *Thyrintina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae) (PEREIRA *et al.* 2009).

Com um crescimento cada vez mais constante, o controle biológico com o uso dos fungos entomopatogênicos tem sido utilizado no Brasil. Seu potencial de uso no MIP é aumentado por seguir um desenvolvimento via "industrial", com sistemas de produção em massa desenvolvidos para fornecer grandes quantidades de inóculo que podem ser formulados e aplicados repetidamente como sprays, grânulos e pó molhável (BROWNBRIDGE, 2006).

A utilização simultânea de parasitoides e fungos entomopatogênicos é uma alternativa para ampliar o controle sustentável de insetos pragas (POTRICH *et al.* 2009; POLANCZYK

*et al.*, 2010; ROSSONI *et al.*, 2014). Seletivos e específicos, ambos envolvem-se em diferentes segmentos do controle biológico (ROSSONI *et al.*, 2014).

Entre os fungos superiores existem aqueles com características entomopatogênicas efetivas que podem ser transformados em produtos comerciais. A esta classe pertencem *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin que tem como hospedeiros uma grande variedade de indivíduos das ordens Acari, Coleoptera, Hemiptera e Lepidoptera (ROSSONI *et al.*, 2014)

Para que uma associação seja possível torna-se necessário conhecer a estrutura e o funcionamento da teia alimentar, sem que haja predação intraguilda. O que permite a manipulação da diversidade e a conservação das espécies desejáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade do parasitoide *P. elaeisis* em pupas de *T. molitor* sob a presença dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e estudar o efeito desta interação na reprodução do parasitoide.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Insetos e no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, no município de Diamantina, Minas Gerais.

Obtenção de culturas puras e suspensões de inóculo de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Foram utilizados os produtos comerciais Metarril® WP E9 e Boveril® WP PL63 produzidos pela empresa Koppert Biological Systems. Para obtenção de cultura pura dos fungos 0,1g de cada produto comercial foi suspenso em 10mL de solução aquosa do espalhante Tween® 80 (0,01%) esterilizada. Após agitação a suspensão foi diluída em solução aquosa de Tween® 80 (0,01%) esterilizada e obtida a concentração de 100 conídios mL<sup>-1</sup>, utilizando uma câmara Neubauer em microscópio. Em seguida, espalharam-se 0,1 mL da suspensão de cada fungo em 10 placas de Petri (diâmetro 9 mm) contendo meio Ágar de dextrose Sabouraud. Esses esporos foram incubados a 25 °C por 5 dias com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, fragmentos de micélio foram retirados de colônias isoladas e repicadas para o mesmo meio de cultura e crescidos por mais 15 dias nas mesmas condições. A partir dessas, novas culturas de 15 dias de idades foram produzidas nas mesmas condições e destas foram obtidas as suspensões de conídios adicionando-se 10 mL da solução esterelizada de Tween® 80 a 0,01%

e esfregando-se a alça de Drigalsky. Os conídios foram transferidos para tubos de ensaio esterilizados, homogeneizadas com agitação por 1 min, e sua quantidade foi padronizada para  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  com auxílio da câmara Neubauer em microscópio. Para o tratamento controle uma solução esterilizada com 0,01% e Tween<sup>®</sup> 80 foi utilizada. Todas as suspensões de conídios apresentavam mais de 90% de conídios viáveis.

## BIOENSAIO 1

Avaliação do parasitismo de *Palmistichus elaeisis* sobre pupas de *Tenebrio molitor* expostas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Vinte e uma pupas de *T. molitor* com menos de 24 horas de idade, por tratamento, foram obtidas da criação massal do laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM. *Tenebrio molitor* se apresenta como um hospedeiro alternativo ideal para performance reprodutiva de *P. elaeisis*, além de baixo custo de reprodução (Zanuncio *et al.*, 2008). As pupas foram mergulhadas nas suspensões dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* na concentração  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e retiradas logo em seguida. O controle foi composto por uma solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01% esterilizada. Em seguida, as pupas foram individualizadas em tubos de vidro (14 x 2,2 cm) e expostas ao parasitismo por seis fêmeas de *P. elaeisis* com 2 dias de idade, por 72 horas. Após este período a taxa de parasitismo foi avaliada. Logo após a emergência dos indivíduos das pupas de *T. molitor* foram avaliados o número de fêmeas emergidas, a razão sexual dos descendentes e a duração do ciclo ovo-adulto.

## BIOENSAIO 2

Parasitismo e longevidade das fêmeas de *Palmistichus elaeisis* expostas aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Fêmeas de *P. elaeisis* que caminharam sobre as pupas do bioensaio I foram mantidas no mesmo ambiente. No interior de cada tubo, uma gotícula de mel foi fornecida para alimentação (Zanuncio *et al.*, 2008). Em cada tubo foi ofertado novamente uma pupa de *T. molitor* (sem tratamento) e exposta ao parasitismo por 72 horas. Após este período, as pupas foram transferidas individualmente para tubos de vidro (14 x 2,2 cm) e a taxa de parasitismo foi avaliada. Logo após a emergência dos indivíduos das pupas de *T. molitor* foram avaliados

o número de fêmeas emergidas, a razão sexual dos descendentes e a duração do ciclo ovo-adulto. As fêmeas de *P. elaeisis* de cada tratamento, após o parasitismo, foram mantidas para avaliação da longevidade.

### BIOENSAIO 3

Emergência de *Palmistichus elaeisis* em pupas de *Tenebrio molitor* expostas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Vinte e uma pupas de *T. molitor*, por tratamento, já parasitadas por 72 horas por fêmeas *P. elaeisis* ambos obtidos da criação massal do laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, foram mergulhadas em suspensões dos conídios de *B. Bassiana* e *M. anisopliae* na concentração  $10^7$  e  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> e retiradas logo em seguida. O controle foi composto por uma solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01% esterelizada. As pupas foram individualizadas em tubos de vidro (14 x 2,2 cm) e após a emergência o número de fêmeas emergidas, razão sexual dos descendentes e a duração do ciclo ovo-adulto foram avaliados.

### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente causalizado com 21 repetições. A taxa de parasitismo foi calculada pelo teste de Qui-quadrado, ( $p \leq 0,05$ ). Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e as médias da longevidade foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e para demais variáveis utilizou-se o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

### BIOENSAIO 1

Avaliação do parasitismo de *Palmistichus elaeisis* sobre pupas de *Tenebrio molitor* expostas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

O parasitismo das fêmeas de *P. elaeisis* em pupas de *T. molitor* reduziu com a presença dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* quando o hospedeiro entrou em contato com os fungos antes de sofrerem a ação do parasitoide (tabela 1). Somente no tratamento com *M. anisopliae*  $10^7$  o parasitismo das pupas pelas fêmeas de *P. elaeisis* foi igual ao controle. Não

ocorreu a ação de parasitismos pelas fêmeas de *P. elaeisis* em pupas de *T. molitor*, quando as pupas foram previamente expostas na suspensão de *B. bassiana* na concentração de  $10^8$ .

A taxa de emergência de fêmeas de *P. elaeisis*, por pupa parasitada, diferiu do controle no tratamento com *M. anisopliae*  $10^8$ , com emergência de 83,29 fêmeas em 35% de pupas parasitadas (Tabela 1).

A razão sexual e o ciclo ovo-adulto de *P. elaeisis* não diferiram do controle para nenhum dos tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Taxa de parasitismo, média do número de fêmeas emergidas, razão sexual, duração de ciclo ovo-adulto de *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) oriundos de pupas de *Tenebrio molitor* expostas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) (Vuill) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e posteriormente parasitadas

Tratamento	Parasitismo %	Fêmeas emergidas <sup>1</sup>	Razão Sexual <sup>1</sup>	Ciclo Ovo-Adulto <sup>1</sup>
Controle	50	29,10 ± 18,4	0,87 ± 0,33	26,8 ± 3,53
<i>B. bassiana</i> $10^7$	5 <sup>-</sup>	66,0 <sup>ns</sup> ± 0,0	0,90 <sup>ns</sup> ± 0,0	27,00 <sup>ns</sup> ± 0,0
<i>B. bassiana</i> $10^8$	0	0	0	0
<i>M. anisopliae</i> $10^7$	35 <sup>ns</sup>	83,29 <sup>+</sup> ± 14,22	0,83 <sup>ns</sup> ± 0,33	25,29 <sup>ns</sup> ± 4,73
<i>M. anisopliae</i> $10^8$	15 <sup>-</sup>	38,33 <sup>ns</sup> ± 16,75 <sup>n</sup>	0,86 <sup>ns</sup> ± 0,34	25,67 <sup>ns</sup> ± 5,61

<sup>1</sup>por pupa parasitada. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup>Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett;

## BIOENSAIO 2

Parasitismo e longevidade das fêmeas de *Palmistichus elaeisis* expostas aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

As fêmeas de *P. elaeisis* que tiveram contato com os fungos, caminhando sobre as pupas expostas à *B. bassiana* e *M. anisopliae* obtiveram uma taxa de parasitismo semelhante ao controle em todos os tratamentos, exceto o parasitismo das fêmeas de *P. elaeisis* que teve contato com a suspensão de *Beauveria bassiana* a  $10^8$ , ocorrendo em uma taxa superior ao controle de 35% (tabela 2).

A emergência de fêmeas de *P. elaeisis*, por pupa parasitada, foi maior nas duas concentrações de *B. bassiana* (tabela 2). Os tratamentos com os fungos *M. anisopliae*, em ambas as concentrações, foram semelhantes ao controle.

A razão sexual de *P. elaeisis* reduziu nos tratamentos de *B. bassiana* 10<sup>7</sup> e *M. anisopliae* 10<sup>8</sup> (Tabela 2).

O ciclo ovo-adulto e a longevidade das fêmeas de *P. elaeisis* não sofreram alterações com a exposição das fêmeas de *P. elaeisis* nas suspensões dos fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* e *M. anisopliae*, em nenhum dos tratamentos (Gráfico 01).

**Tabela 2** – Taxa de parasitismo, média do número de fêmeas emergidas, razão sexual, duração de ciclo ovo-adulto e longevidade das fêmeas de *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) em contato com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) (Vuill) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok oriundas de pupas de *Tenebrio molitor*.

Tratamento	Parasitismo %	Fêmeas emergidas <sup>1</sup>	Razão Sexual	Ciclo ovo-adulto <sup>2</sup>	Longevidade <sup>2</sup>
Controle	45	26,78 ± 11,04	0,932 ± 0,046	30,4 ± 3,86	8,40 <sup>a</sup> ± 4,46
<i>B. bassiana</i> 10 <sup>7</sup>	60 <sup>ns</sup>	69,77 <sup>+</sup> ± 27,28	0,783 <sup>-</sup> ± 0,079	27,43 <sup>ns</sup> ± 3,11	6,50 <sup>a</sup> ± 3,46
<i>B. bassiana</i> 10 <sup>8</sup>	80 <sup>+</sup>	78,06 <sup>+</sup> ± 29,7	0,902 <sup>ns</sup> ± 0,03	27,50 <sup>ns</sup> ± 4,96	6,89 <sup>a</sup> ± 4,46
<i>M. anisopliae</i> 10 <sup>7</sup>	55 <sup>ns</sup>	47,64 <sup>ns</sup> ± 41,32	0,845 <sup>ns</sup> ± 0,09	28,64 <sup>ns</sup> ± 4,86	6,50 <sup>a</sup> ± 4,64
<i>M. anisopliae</i> 10 <sup>8</sup>	50 <sup>ns</sup>	44,60 <sup>ns</sup> ± 26,32	0,753 <sup>-</sup> ± 0,041	29,1 <sup>ns</sup> ± 3,96	6,25 <sup>a</sup> ± 4,6

<sup>1</sup>por pupa parasitada. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup>Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett; <sup>2</sup>As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

### BIOENSAIO 3

Emergência de *Palmistichus elaeisis* em pupas de *Tenebrio molitor* expostas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

A média de fêmeas de *P. elaeisis* emergidas por pupa parasitada foi igual ao controle em todos os tratamentos (Tabela 3), exceto no tratamento com *M. anisopliae* 10<sup>8</sup>, onde a média das fêmeas emergidas foi maior, 110,25 em 60% das pupas parasitadas.

A razão sexual e o ciclo ovo-adulto de *P. elaeisis* emergidos das pupas de *T. molitor*, foi semelhante à testemunha para todos os tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Taxa de parasitismo, média do número de fêmeas emergidas, razão sexual de fêmeas, duração de ciclo ovo-adulto de *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) oriundos de pupas de *Tenebrio molitor* previamente parasitadas e expostas aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) (Vuill) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

Tratamento	Fêmeas Emergência <sup>1</sup>	Razão Sexual <sup>1</sup>	Ciclo ovo-adulto <sup>1</sup>
Controle	63,29 ± 26,84	0,909 ± 0,14	26,06 ± 3,08
<i>B. bassiana</i> 10 <sup>7</sup>	65,33 <sup>ns</sup> ± 24,31	0,916 <sup>ns</sup> ± 0,07	25,17 <sup>ns</sup> ± 4,1
<i>B. bassiana</i> 10 <sup>8</sup>	63,93 <sup>ns</sup> ± 26,73	0,938 <sup>ns</sup> ± 0,082	26,17 <sup>ns</sup> ± 4,76
<i>M. anisopliae</i> 10 <sup>7</sup>	80,85 <sup>ns</sup> ± 24,69	0,867 <sup>ns</sup> ± 0,075	25,75 <sup>ns</sup> ± 5,01
<i>M. anisopliae</i> 10 <sup>8</sup>	110,25 <sup>+</sup> ± 0,14	0,886 <sup>ns</sup> ± 0,054	24,08 <sup>ns</sup> ± 4,08

<sup>1</sup>por pupa parasitada. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett em nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup> Não significativo, <sup>+</sup> Significativo e superior ao controle, <sup>-</sup> Significativo e inferior ao controle, pelo teste de Dunnett;

## DISCUSSÃO

O aumento do número de inimigos naturais em programas do MIP para suprimir espécies pragas pode ser conseguido com a associação dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com o parasitoide *P. elaeisis*. Porém, essa interação pode gerar alguns resultados antagônicos no agroecossistema.

A redução do parasitismo é observada quando fêmeas de *P. elaeisis* entram em contato com pupas de *T. molitor* expostas aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. *Trichogramma* ssp (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são capazes de reconhecer ovos infectados com fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* evitando assim o parasitismo destes hospedeiros (POTRICH *et al.*, 2009). Esse resultado sugere que a redução de parasitismos das fêmeas de *P. elaeisis* quando seu hospedeiro é exposto ao fungo *B. bassiana* nas concentrações 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> e ao fungo *M. anisopliae* na concentração 10<sup>8</sup>, indica a hipótese que as fêmeas de *P. elaeisis* foram capazes de reconhecer hospedeiros contaminados por entomopatógenos, evitando o parasitismo (POTRICH *et al.*, 2009). A exposição das pupas de *T. molitor* ao fungo *M. anisopliae* na concentração 10<sup>7</sup> permitiu o parasitismo de fêmeas de *P. elaeisis*. Larvas de *T. molitor* apresentaram resposta imune ativada por lipopolissacarídeos (LPS) ao fungo *M. anisopliae* estudado na concentração de 2 × 10<sup>6</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>. A resistência à infecção do *M. anisopliae* é aumentada com melanização cuticular (BARNES; SIVA-JOTHY, 2000, MORET; SIVA-JOTHY, 2003). A não rejeição de pupas expostas a *M. anisopliae* na concentração 10<sup>7</sup> pelas fêmeas de *P. elaeisis* indica que possa ter ocorrido supressão da infecção por *M. anisopliae* nas pupas hospedeiras permitindo o parasitismo.

A nova oferta de hospedeiros sem exposição aos fungos para as fêmeas do Bioensaio I, que em sua maioria rejeitaram as pupas contaminadas pelos fungos, mostra que as fêmeas de



*P. elaeisis* reservaram suas energias aguardando hospedeiros adequados ao parasitismo. A rejeição ao hospedeiro ocorre durante a tentativa de oviposição, quando a fêmea introduz o ovipositor no interior do hospedeiro ou pelo toque com as antenas (VINSON, 1997, Magalhães et al 1998). Isto indica que as fêmeas do Bioensaio I, entraram em contato com as pupas expostas aos fungos e reservando sua energia metabólica em busca de hospedeiros adequados (MENEZES *et al.*, 2012, CAMILO *et al.*, 2015) recuperando a taxa de parasitismo. Este resultado indica uma atuação sinérgica entre fungos entomopatogênicos e o parasitoide *P. elaeisis* em uma possível associação no MIP, a presença dos fungos entomopatogênicos não altera a capacidade de parasitismo nas fêmeas de *P. elaeisis*.

A emergência de fêmeas de *P. elaeisis* em pupas parasitadas antes e após a exposição em suspensões de *B. bassiana* e *M. anisopliae* diferiu do controle apenas na presença do fungo *M. anisopliae*, com maior número de fêmeas emergidas por pupa nos dois bioensaios. A capacidade de supressão da infecção por *M. anisopliae* pelas pupas de *T. molitor* podem ter contribuído para um maior número de fêmeas emergidas. A oferta de um hospedeiro adequando também permitiu que as fêmeas de *P. elaeisis* que rejeitaram as pupas expostas aos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana*, em ambas as concentrações, apresentassem um maior número de fêmeas emergidas. Variações no número de indivíduos emergidos e razão sexual do parasitoide estão relacionadas com a qualidade nutricional do hospedeiro. Ao ser parasitado o hospedeiro passa a ser fonte de alimento e o abrigo dos endoparasitoides, sua qualidade torna-se um fator de caracterização da nova prole (HUNTER 2003).

A razão sexual em todos os bioensaios apresenta o número de fêmeas sempre superior ao número de machos. O que para o controle biológico é essencial, pois, um maior número de fêmeas no campo aumenta a taxa de parasitismo e torna o controle biológico mais eficiente (ZANUNCIO *et al.*, 2008, VACARI *et al.* 2012).

O ciclo ovo-adulto de *P. elaeisis* em pupas de *T. molitor* expostas aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* não diferiu do controle em nenhum dos tratamentos nos três bioensaios estudados, mostrando que esses entomopatógenos não afetam o desenvolvimento do parasitoide. Os parâmetros biológicos de *C. flavipes* em pupas de *D. saccharalis* tratadas com formulações comerciais de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* não foram afetados. Ocorrendo, sem alterações, o desenvolvimento do parasitoide (ROSSONI *et al.*, 2014). *Palmistichus elaeisis* parasitam e se desenvolvem na fase de pupa do hospedeiro, instar mais resistente à penetração e infecção por entomopatógenos (ARMITAGE; SIVA-JOTHY 2005; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; MAHDAVI *et al.*, 2013). Além da proteção do hospedeiro, as fêmeas de



*P. elaeisis* durante o parasitismo injetam toxinas que neutralizam a ação imunológica do hospedeiro e de agentes infectantes (SCHMID-HEMPEL, 2001, SCHMID-HEMPEL 2005, PASTORI *et al.*, 2012).

Os fungos entomopatogênicos não foram capazes de alterar a longevidade das fêmeas que caminharam sobre as pupas expostas. A longevidade de fêmeas de *T. pretiosum* não foi afetada pelo contato com ovos pulverizados com os isolados *B. bassiana* (POTRICH *et al.* 2015). Uma maior longevidade das fêmeas beneficia a população de parasitoides (CAMILO *et al.*, 2015) e reflete um eficiente gasto energético na escolha de um hospedeiro adequado promovendo uma melhor qualidade da prole (ROYER *et al.*, 1999, MENEZES *et al.*, 2012).

## CONCLUSÃO

A associação do parasitoide *P. elaeisis* com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* pode ser compatível, pois a capacidade de parasitismo das fêmeas de *P. elaeisis* não é alterada para testes em laboratório. Podendo ocorrer liberações simultâneas destes agentes, o que possibilita o uso de ambos em programas de manejo integrado de pragas.

## REFERÊNCIAS

ARMITAGE, S. A. O.; SIVA-JOTHY, M. T. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. **Heredity**, v. 94, n. 6, p. 650, 2005.

BARNES, A. I.; SIVA-JOTHY, M. T. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1439, p. 177-182, 2000.

BROWNBRIDGE, M. *et al.* Field application of biopolymer-coated *Beauveria bassiana* F418 for clover root weevil (*Sitona lepidus*) control in Waikato and Manawatu. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p. 304, 2006.

COLINET, H.; BOIVIN, G. Insect parasitoids cold storage: a comprehensive review of factors of variability and consequences. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 83-95, 2011.

CAMILO, S. S *et al.* Plantas hospedeiras de *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) afetam o desenvolvimento do parasitoide *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, 2015.

HUNTER, M. D. Effects of plant quality on the population ecology of parasitoids. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2003.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 159-185, 2010.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 697-743, 2007.

MAHDAVI, V. *et al.* Susceptibility of the Hymenopteran parasitoid, *Habrobracon hebetor* (Say)(Braconidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 17-20, 2013.

MENEZES, C.W.G. *et al.* Reproductive and toxicological impacts of herbicides used in Eucalyptus culture in Brazil on the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Weed Research**, v. 52, p. 520–525, 2012.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1532, p. 2475-2480, 2003.

PARRA, J.R.P. Biological Control of Pests in Brazil: history, current status and perspectives. *Ciência e Ambiente*, v. 4, p. 7-18, 2011.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.

PEREIRA, F. F. *et al.* Species of Lepidoptera Defoliators of Eucalyptus as New Host for the Parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 259-262, 2009.

PASTORI, P. L. *et al.* Densidade de fêmeas de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) para sua reprodução em pupas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 525-532, 2012.

POLANCZYK, A.R. *et al.* Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin nos parâmetros biológicos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera:Trichogrammatidae) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1412-1416, 2010.

POTRICH, M. *et al.* Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 822-826, 2009.

POTRICH, M. *et al.* Interactions between *Beauveria bassiana* and *Trichogramma pretiosum* under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 3, p. 213-221, 2015.

ROSSONI, C. *et al.*. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, v. 97, n. 4, p. 1794-1804, 2014.

ROYER, L. *et al.* Intra-and interspecific host discrimination by host-seeking larvae of coleopteran parasitoids. **Oecologia**, v. 118, n. 1, p. 59-68, 1999.

SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U.; STRAND, M.. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. **BioEssays**, v. 23, n. 4, p. 344-351, 2001.

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 529-551, 2005.

SOARES M. A.; *et al.*. Superparasitismo de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) y comportamiento de defensa de dos hospederos. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 35, p. 62-65, 2009.

SOARES M. A. *et al.*. Controle biológico de pragas em armazenamento: uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos no Brasil?. **Unimontes Científica**, v. 11, n. 1/2, p. 52-59, 2011.

VACARI, A. M. *et al.* Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, p. 355-361, 2012.

ZANUNCIO, J. C. *et al.* *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare & Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae). **The Coleopterists Bulletin**, v. 62, p. 64-66, 2008.

ZANUNCIO J. C. *et al.* Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 245-250, 2018.

## CONCLUSÃO GERAL

As formulações comerciais do glifosato são fatores antropogênicos com influências sinérgica ou antagônica sobre os fungos entomopatogênicos. Onde maiores concentrações são as mais prejudiciais aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

A patogenicidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a *A. gemmatilis* não foi afetada pelas formulações comerciais de glifosato.

A associação dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com o parasitoide *P. elaeisis* mostrou ser compatível para o controle de pragas.